

Hypoxie-induzierte Vasomotorik der Arteria mesenterica superior der Maus

Julia Anna Westhoff



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Hypoxie-induzierte Vasomotorik
der Arteria mesenterica superior der Maus**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Julia Anna Westhoff

aus Frankfurt am Main

Gießen 2015

Aus der Klinik für Anästhesiologie, Operative Intensivmedizin und Schmerztherapie

Kommissarische Leitung: Prof. Dr. med. Michael Henrich D.Phil. M.A.

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Henrich, D. Phil

Gutachter: Prof. Dr. Ralph Schermuly

Tag der Disputation: 15.12.2015

Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1) Einleitung	1
1.1) Grundlagen der Vasomotorik.....	1
1.2) Die Funktion des Endothels bei der Vasomotorik.....	2
1.2.1) Endothelabhängige vasodilatierende Faktoren	4
1.2.2) Endothelabhängige vasokonstringierende Faktoren	9
1.3) Der Einfluss der glatten Muskulatur bei der Vasomotorik.....	10
1.4) Kaliumkanäle im Endothel und in den glatten Gefäßmuskelzellen	11
1.4.1) Einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle (K_{IR}).....	11
1.4.2) Spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_V).....	11
1.4.3) Calcium-aktivierte Kaliumkanäle (K_{Ca}).....	11
1.4.4) Tandemporen-Kaliumkanäle (K_{2P})	12
1.5) Hypoxie und ihre Folgen auf zellulärer Ebene	13
2) Fragestellung und Ziel der Arbeit	16
2.1) Wird der Ruhetonus der Arteria mesenterica superior der Maus durch verschiedene Sauerstoffkonzentrationen verändert? Wenn ja, in welche Richtung findet die Veränderung statt? Sind im mesenterialen Gefäßgebiet Spontanoszillationen nachweisbar und werden diese vom Grad der Hypoxie beeinflusst?.....	16
2.2) Ist die veränderte Vasomotorik abhängig vom Grad der Hypoxie? Wie stark ist die Veränderung des Ruhetonus im Vergleich zur maximalen Reaktion des Arteriensegmentes? ..	16
2.3) Welche Signalmoleküle sind involviert?	17
2.3.1) Ist die Vasomotorik calciumabhängig?	17
2.3.2) Welchen Einfluss hat Stickstoffmonoxid?	17
2.4) Inwieweit ist die Reaktion der Arterie durch Tandemporen-Kaliumkanäle, im Speziellen den TASK1-Kanal, geprägt?	17
3) Material und Methoden	18
3.1) Verwendete Untersuchungstiere	18
3.2) Versuchsvorbereitungen und -aufbau	18
3.2.1) Vorbereitungen	18
3.2.2) Präparation der Arteria mesenterica.....	19
3.2.3) Aufbau des Messstandes	20

Inhaltsverzeichnis

3.3)	Messung des Arterien­durchmessers	22
3.3.1)	Zeitlicher Versuchsablauf	23
3.3.2)	Vorversuche	24
3.3.3)	Versuchsreihen	27
3.4)	Oszillationen	28
3.5)	Auswahl der Versuche zur Auswertung	29
3.6)	Statistik und Auswertung der Messwerte	29
4)	Ergebnisse	31
4.1)	Hypoxie-induzierte Vasomotorik in der Kontrollgruppe	31
4.2)	Einfluss des Calciums auf die Hypoxie-induzierte Vasomotorik	34
4.2.1)	Vasomotorik in calciumfreier Tyrode-Lösung	34
4.2.2)	Vasomotorik bei Blockade des Calciumeinstromes von extrazellulär durch NiCl_2	38
4.3)	Einfluss der eNOS auf die Hypoxie-induzierte Vasomotorik	40
4.4)	Einfluss des TASK1-Kaliumkanals auf die Hypoxie-induzierte Vasomotorik	44
4.5)	Oszillationen des Arterien­durchmessers	47
4.5.1)	Amplitude der Durchmesserschwankungen	47
4.5.2)	Frequenz der Einzelausschläge	48
4.5.3)	Zeitlicher Anteil der Oszillationen an der Versuchszeit	49
4.5.4)	Einfluss der Phenylephrin-Konzentration auf die Oszillationszeit	50
4.6)	Zusammenfassung der Ergebnisse	51
5)	Diskussion	55
5.1)	Verwendung der Maus als Versuchsmodell	55
5.2)	Oszillationen des Arterien­durchmessers	55
5.3)	Hypoxische Vasodilatation im mesenterialen Gefäßbett der Maus und Grad der Hypoxie	59
5.4)	Rolle des TASK1-Kanals bei der Hypoxie-induzierten Vasomotorik	60
5.5)	Einfluss von Calcium auf die Hypoxie-induzierte Vasomotorik	62
5.6)	Einfluss von NO auf die Hypoxie-induzierte Vasomotorik	65
6)	Zusammenfassung	69
7)	Summary	71

Inhaltsverzeichnis

8)	Abkürzungsverzeichnis	73
9)	Abbildungsverzeichnis	76
10)	Tabellenverzeichnis.....	78
11)	Literaturverzeichnis	79
12)	Anhang	88
12.1)	Datentabellen.....	88
12.2)	Danksagung.....	90

1) Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Regulation der Vasomotorik im intestinalen Gefäßbett der Maus, im Speziellen mit der Arteria mesenterica superior – oder auch cranialis.

Wie beim Menschen auch, umfasst das Versorgungsgebiet der Arteria mesenterica superior der Maus den gesamten Dünndarm und einen großen Teil des Dickdarmes. Circa ein Fünftel des Herzzeitvolumens fließt in die Durchblutung des Darmes. Die Regulation der Darmdurchblutung dient zum einen der Anpassung der Blutversorgung auf die Nahrungsaufnahme, zum anderen kann bei kritischen Kreislaufverhältnissen durch intestinale Vasokonstriktion Volumen für den Gesamtkreislauf bereitgestellt werden.

In 85% der Fälle von kritischer Darmischämie ist die Arteria mesenterica superior betroffen (30). Man unterscheidet zwischen okklusiver mesenterialer Ischämie, die durch einen Thrombus oder Embolus verursacht wird, und non-okklusiver mesenterialer Ischämie, die durch Herabsetzung der Perfusion des Splanchnikusgebietes herbeigeführt wird. Non-okklusive mesenteriale Ischämien sind vor allem im Zusammenhang mit herzchirurgischen Eingriffen, kardiogenem und septischem Schock beschrieben (101), werden jedoch auch durch den lang anhaltenden Einsatz von hochdosierten Katecholaminen hervorgerufen. Die Inzidenz der mesenterialen Ischämie liegt bei 1/100.000 Einwohner pro Jahr in Europa und ihre Mortalität betrug in den Jahren 1985 - 2001 durchschnittlich 70% (66). Bei einer kritischen Minderperfusion des Darmes kann es zu einer Durchwanderung der Darmwand mit Bakterien kommen, da die Barrierefunktion der Schleimhaut nicht mehr aufrechterhalten werden kann. Über diesen Mechanismus kann es zu einer systemischen Entzündungsreaktion des Körpers (SIRS) und nachfolgend zu einer Sepsis kommen (101).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Vasomotorik unter Hypoxie im mesenterialen Gefäßbett und ihre möglichen Einflussfaktoren zu zeigen.

1.1) Grundlagen der Vasomotorik

Der Ruhetonus der Gefäße wird in vivo durch lokale und neurogene Einflüsse bestimmt.

Den neurogenen Einfluss auf den Ruhetonus haben in vivo postganglionäre sympathische und sensible Fasern, die in den Gefäßen zwischen Adventitia und Media

verlaufen. Arterien sind wesentlich dichter innerviert als Venen. Noradrenalin wird – zum Teil mit Adenosintriphosphat (ATP) als Kotransmitter – pulsatil (1-2 Mal pro Sekunde) ausgeschüttet und löst über Adrenorezeptoren der glatten Muskulatur Depolarisationen, Calciumeinstrom und somit Kontraktionen aus.

Die lokalen metabolischen Einflüsse umfassen mehrere Faktoren. Die Erhöhung des CO_2 -Partialdruckes oder der Protonen-Konzentration führt, wie auch eine erhöhte Konzentration an Kaliumionen, zur Vasodilatation. Auch Mediatoren wie Bradykinin und Acetylcholin bewirken eine Vasodilatation. Die dilatatorische Wirkung von Acetylcholin ist von intaktem Endothel abhängig, bei Schädigung des Endothels führt Acetylcholin zur Vasokonstriktion (42,106).

Für die Vasomotorik spielen zwei Zelltypen die Hauptrollen: die Endothelzellen und die glatten Gefäßmuskelzellen. Während die Gefäßdilataion meist durch endotheliale Signalwege vermittelt ist, wird die Konstriktion des Arteriensegmentes durch die glatte Gefäßmuskulatur erreicht. Endothelzellen können über Botenstoffe, wie Endothelin oder Thromboxan, auch eine Vasokonstriktion auslösen. Die resultierende Gefäßreaktion auf einen Stimulus ergibt sich aus dem Überwiegen der dilatatorischen oder der konstriktorischen Antwort der Endothel- bzw. der glatten Muskelzellen.

Zwischen Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen bestehen über myoendotheliale Gap-Junctions (MEGJ) Verbindungen, welche die direkte Zell-zu-Zell-Kommunikation, wie zum Beispiel einen Calciumfluss, ermöglichen (100). Sandow et al. konnten MEGJ in Mesenterialarterien von Ratten elektronenmikroskopisch fotografieren. Die Anzahl dieser sehr kleinen (<100 nm) MEGJ nimmt mit sinkendem Arterienradius zu (99). Mit Abnahme des Arterienradius nimmt auch die Vasomotorik, die über den Endothelium-Derived-Hyperpolarizing-Factor (EDHF)-Signalweg vermittelt wird, zu. Bei diesem Signalweg spielen MEGJ für die Kommunikation zwischen Endothel- und glatter Muskelzelle eine große Rolle (105) (siehe Kapitel 1.2.1.3).

1.2) Die Funktion des Endothels bei der Vasomotorik

Furchgott und Zawadzki fanden 1980 heraus, dass die Vasodilatation durch Acetylcholin in der Kaninchen Aorta vom Vorhandensein des Endothels abhängt (42). In den folgenden Jahren wurde ein Endothelium-Derived-Relaxing-Factor (EDRF) für die endothelabhängige Vasodilatation verantwortlich gemacht. EDRF wurde 1987 als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert (43,57,89).

Die endothelabhängige Vasodilatation ist von insgesamt drei Faktoren bestimmt: NO, Prostaglandin I_2 (PGI_2 , Prostazyklin) und EDHF.

Freies intrazelluläres Calcium in der Endothelzelle

Von der Konzentration der intrazellulären Calciumionen in der Endothelzelle hängen wichtige Signalwege ab: Ein Anstieg an freien Calciumionen bewirkt die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS oder NOS3) und damit eine erhöhte NO-Synthese. Außerdem aktiviert eine hohe Calciumkonzentration die Phospholipase A_2 , was wiederum zum Anstieg der PGI_2 -Synthese führt. Auch der EDHF-Signalweg ist von einer hohen Calciumkonzentration abhängig (20,37).

Die Regulation des Calciumhaushaltes der Endothelzelle zeigt Abbildung 1.

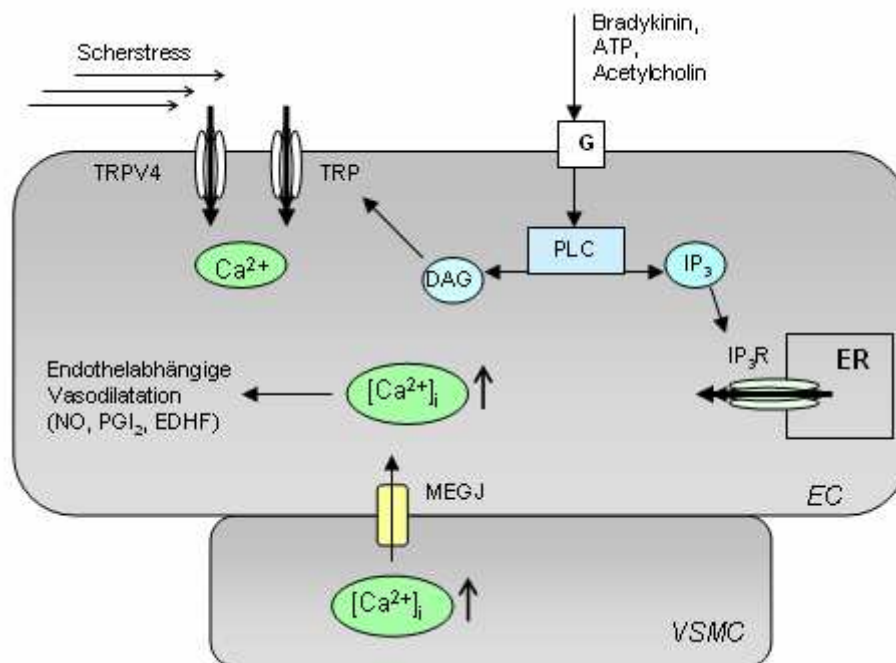


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Calciumregulation in der Endothelzelle

Über die Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (G) der Endothelzelle (EC) bewirken Bradykinin, ATP und Acetylcholin eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Das führt zu einer Synthese von Inositoltriphosphat (IP_3), welches über den IP_3 -Rezeptor (IP_3R) einen Calciumeinstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) bewirkt. Die intrazelluläre Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) steigt. Außerdem wird Diacylglycerol (DAG) synthetisiert, das zum Öffnen von Transient-receptor-potential (TRP)-Kanälen und damit zum Calciumeinstrom führt (36). Es gibt Hinweise, dass mechanischer Scherstress den TRPV4-Kanal (transient-receptor-potential-vallinoid type 4) aktiviert, über den Calciumeinstrom in die EC ermöglicht und endothelabhängige Vasodilatation getriggert wird (49,81). Eine hohe $[Ca^{2+}]_i$ in der glatten Gefäßmuskelzelle (VSMC) kann über myoendotheliale Gap-Junctions (MEGJ) zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in der EC und zur Aktivierung der oben beschriebenen calciumabhängigen Signalwege führen (63).

1.2.1) Endothelabhängige vasodilatierende Faktoren

Verschiedene Faktoren, die im Endothel synthetisiert werden, haben entscheidenden Einfluss auf die Vasomotorik. Im Folgenden wird die Bedeutung einzelner Signalmoleküle näher erörtert.

1.2.1.1) Stickstoffmonoxid (NO)

NO wird von der eNOS gebildet. Dieses Enzym ist membranständig und bildet bei Aktivierung aus L-Arginin NO und L-Citrullin. Die Funktion der eNOS ist vom Vorhandensein von molekularem Sauerstoff abhängig (71,97).

Die basale NO-Ausschüttung und damit die Regulation des cyclischen Guanosinmonophosphat (cGMP)-Spiegels der VSMC (siehe Abbildung 2) hat einen wesentlichen Einfluss auf die Reaktionsbereitschaft des Gefäßes (22). Allein die Perfusion einer Mesenterialarterie mit physiologischer Elektrolytlösung induziert eine basale NO- und cGMP-Generierung durch den sogenannten Scherstress (22,106).

Da NO ein Gas mit sehr kurzer Halbwertszeit ist, welches nicht in Vesikeln oder anderweitig gespeichert werden kann, ist die Aktivität der eNOS komplex reguliert.

Die eNOS ist in Caveolae membranständig an Caveolin-1 gebunden und in dieser Bindung inaktiv. Bei hoher $[Ca^{2+}]_i$, zum Beispiel als Effekt von G-Protein-vermittelter Bradykinin-Wirkung, bindet aktiviertes Calmodulin die eNOS und aktiviert das Enzym durch Dissoziation der eNOS von Caveolin-1 (36,97). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Scherstress oder Histamin erhöhen die Aktivität des Hitze-Schock-Proteins 90 (Hsp90), welches zusammen mit Calmodulin an die eNOS bindet und die sekundär calciumunabhängige Aktivierung der eNOS über Phosphorylierung bewirkt (17). Die Aktivität der eNOS wird unter anderem durch Phosphorylierung mindestens 5 verschiedener Bindungsstellen durch diverse Proteinkinasen reguliert (11,16,21,36,83,106).

Endotheliales NO diffundiert zu den VSMC, wo es über Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase (sGC) die Konzentration von cGMP reguliert und weitere Signalkaskaden in Gang setzt, die zu einer Dilatation des Gefäßes führen (siehe Abbildung 2).

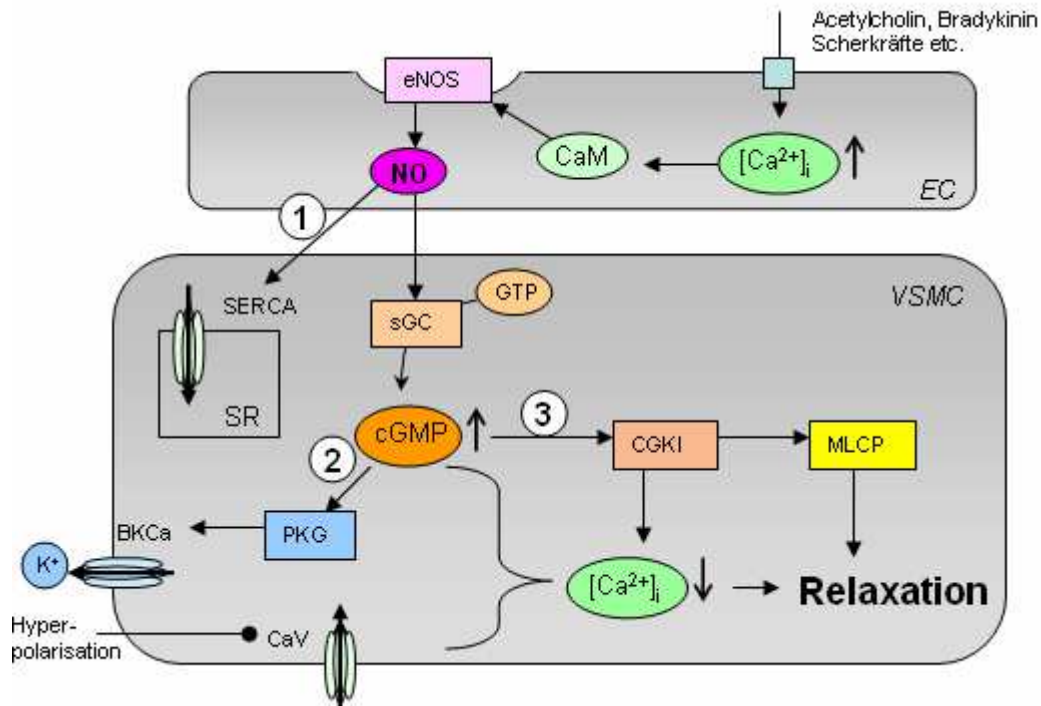


Abbildung 2: NO-Signalweg von der Endothelzelle zur Gefäßmuskelzelle

Calciumanstieg in der EC aktiviert über Calcium-Calmodulin-Komplexbildung (CaM) die eNOS. Neu generiertes NO diffundiert zur VSMC und triggert dort die sGC, die aus Guanosintriphosphat (GTP) cGMP bildet. Zur Relaxation der VSMC kommt es hauptsächlich über 3 Signalwege:

- 1.) NO erhöht cGMP-unabhängig die Aktivität der Sarkoplasmatische-Retikulum- Ca^{2+} -ATPase (SERCA), die Ca^{2+} aus dem Zytosol in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) sequestriert (2).
- 2.) cGMP aktiviert die Proteinkinase G (PKG), welche eine Öffnung des Kaliumkanals (BK_{Ca}) induziert. Es resultiert ein Kaliumausstrom und eine Membranhyperpolarisation, spannungsabhängige Calciumkanäle (Ca_v) schließen und der Calciumeinstrom stoppt (112).
- 3.) cGMP aktiviert die cGMP-abhängige Proteinkinase I (CGKI), welche die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ senkt und gleichzeitig auch über Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLCP) zur Calcium-Desensitivierung führt (36,70,109).

Das Verhältnis der Aktivität der beiden Enzyme Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) und -Phosphatase (MLCP) beeinflusst unabhängig von der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ die Kontraktilität der VSMC. Überwiegt die Aktivität der MLCK, spricht man von einer Calcium-Sensitivierung, bei Überwiegen der MLCP-Aktivität von einer Calcium-Desensitivierung.

Bolz et al. berichteten 1999, dass NO in kleinen Widerstandsgefäßen von Skelettmuskeln die Calciumkonzentration der VSMC nicht senkt, sondern dort über Aktivierung der MLCP eine Calcium-Desensitivierung bewirkt (10). Auch für die cGMP-abhängige Kinase (cGKI) ist eine Aktivierung der MLCP beschrieben (36,70,109).

Die MLCP wird auch durch den Abfall der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, z.B. über den NO-Signalweg, aktiviert. Auch eine Aktivierung der Adenylatcyclase (AC) oder eine Membranhyperpolarisation kann zum Abfall der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und damit zur Relaxation der

VSMC führen.

Eine Hemmung der MLCK führt ebenso zur Calcium-Desensitivierung. Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) ist in der Lage die MLCK zu phosphorylieren und ihre Affinität zu aktiviertem Calmodulin zu verringern, was zur Hemmung der MLCK führt (54). Auch eine Phosphorylierung der MLCK durch die Proteinkinase A führt zur Hemmung des Enzyms und zu einer Calcium-Desensitivierung (27,112).

Wird die MLCP gehemmt kommt es zum Überwiegen der MLCK-Aktivität und somit zur Calcium-Sensitivierung. Dies geschieht über den Rho/RhoKinase Signalweg. Dieser Signalweg wird über agonistenvermittelte G-Protein-Aktivierung in Gang gesetzt. RhoA lagert sich an die Rhokinase an und aktiviert sie so. Die aktivierte Rhokinase hemmt die MLCP und aktiviert das CPI-17 (PKC-potentiated Protein-phosphatase-1 Inhibitor Protein), welches wiederum selbst die MLCP inhibiert (25).

Auch eine erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit der MLCK, zum Beispiel durch Mitogen-activated-Proteinkinasen (MAPK)-vermittelte Phosphorylierung, führt zur Calcium-Sensitivierung (65).

1.2.1.2) Eikosanoide

Vom Endothel werden verschiedene Metabolite der Arachidonsäure freigesetzt. PGI_2 ist einer dieser Metabolite und wirkt über eine Calcium-Desensitivierung vasodilatierend (siehe Abbildung 3).

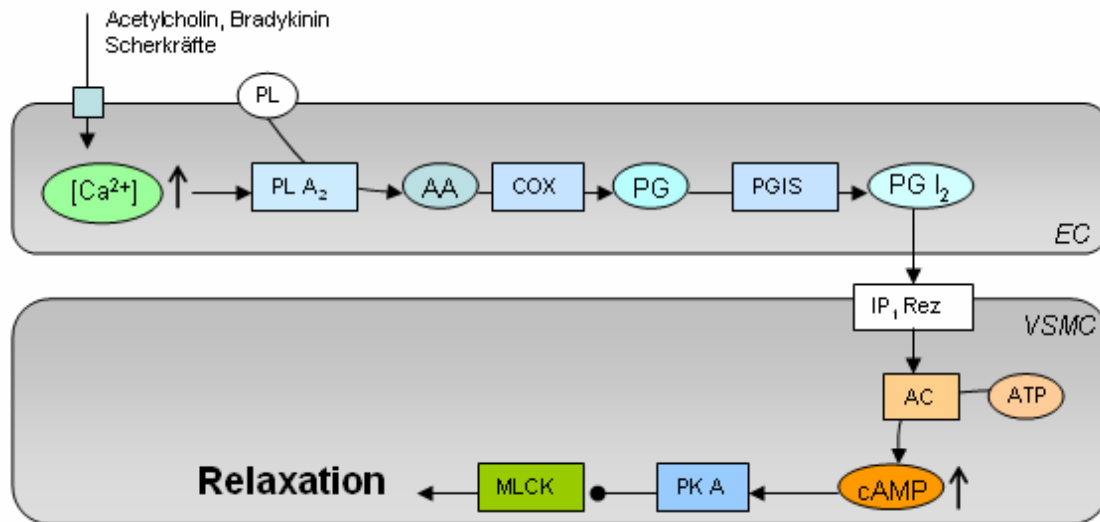


Abbildung 3: Prostaglandin I_2 -Signalweg

Durch einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wird Arachidonsäure (AA) in der EC von der Phospholipase A_2 (PLA_2) aus Phospholipiden (PL) der Zellmembran synthetisiert. Die AA wird durch die Cyclooxygenase (COX) abgebaut, wobei Prostaglandine (PG) entstehen. Die Prostacyclin-Synthase (PGIS) verstoffwechselt PG weiter zum vasoaktiven PGI_2 . Über den G_s -Proteingekoppelten- IP_1 -Rezeptor (IP_1 Rez) an der VSMC kommt es zur Aktivierung der Adenylatcyclase (AC), die aus ATP cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) synthetisiert. Der cAMP Anstieg vermittelt eine Aktivierung der Proteinkinase A, die über Hemmung der MLCK zur Calcium-Desensitivierung und damit zur Relaxation der VSMC führt (106,112).

Für die Prostacyclin-Synthese spielt vor allem die COX-2 eine Rolle (50,79). In sehr hohen Konzentrationen wirkt PGI_2 vasokonstriktorisch. Wenn weniger NO in der EC produziert wird, zum Beispiel bei endothelialer Dysfunktion, tritt die vasodilatierende Wirkung von PGI_2 deutlicher in den Vordergrund (28).

Ein zweiter Abbauweg der AA wird durch eine Gruppe von Cytochrom-P450-abhängigen Enzymen katalysiert. Dabei entstehen Epoxyeicosatriensäuren (EET), von denen vermutet wird, dass sie als vasodilatierende EDHF (siehe Kapitel 1.2.1.3) in Betracht kommen (46). Sie bewirken über eine Aktivierung von TRP-Kanälen einen Calciumeinstrom in die EC (36).

Des Weiteren wird AA in Leukozyten und Makrophagen durch Lipoxygenasen zu Leukotrienen abgebaut, die bei entzündlichen und allergischen Prozessen eine Rolle spielen.

1.2.1.3) EDHF

Die Vasodilatation, die weder durch den NO- noch durch den PGI₂-Signalweg vermittelt ist, wird dem EDHF-Signalweg zugeschrieben (siehe Abbildung 4). Es ist eher unwahrscheinlich, dass es den einen EDHF gibt, vielmehr scheinen mehrere Substanzen über einen gemeinsamen Signalweg die endothelabhängige Hyperpolarisation der Gefäßmuskelzelle auszulösen. Obwohl die EDHF-vermittelte Relaxation ohne NO und PGI₂ funktioniert, scheint ein intakter NO-Signalweg für den EDHF-Signalweg essentiell zu sein (113).

Calcium-aktivierte Kaliumkanäle mit mittlerer (IK_{Ca}) und kleiner (SK_{Ca}) Leitfähigkeit sind in die EDHF-vermittelte Hyperpolarisation involviert (35,112). Edwards et al. vermuteten 1998, dass Kaliumionen in Leber- und Mesenterialarterien von Ratten als EDHF wirken und über einwärts gerichtete Kaliumkanäle (K_{IR}) und Na⁺/K⁺-ATPasen der VSMCs eine Hyperpolarisation bewirken (33). Bolz et al. widerlegten diese These 1999 für Widerstandsgefäße von Skelettmuskeln (10). Unterschiedliche Studien legen nahe, dass es verschiedene EDHF in den verschiedenen Gefäßbetten und bei unterschiedlichen Spezies gibt (94).

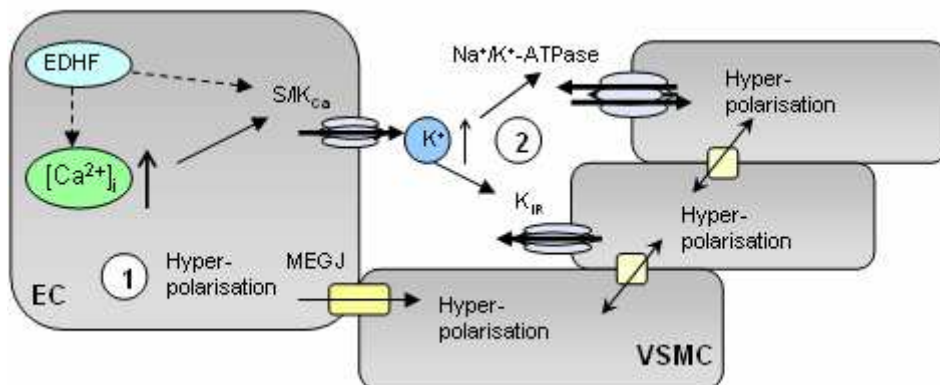


Abbildung 4: EDHF-Signalweg

Durch einen Anstieg der endothelialen [Ca²⁺]_i oder durch direkte Wirkung eines EDHF werden S- und IK_{Ca}-Kanäle der EC aktiviert, über die Kalium ausströmt und die Membran hyperpolarisiert. Die angrenzenden VSMC können über zwei Signalwege hyperpolarisiert werden: 1) die Hyperpolarisation wird direkt von der EC auf die VSMC durch MEGJ übertragen. 2) Durch die hohe Kaliumkonzentration zwischen Endothel- und glatter Gefäßmuskelzelle werden K_{IR}-Kanäle und Na⁺/K⁺-ATPasen der VSMC aktiviert und so eine Hyperpolarisation der VSMC verursacht (20).

Die Hyperpolarisation der VSMC führt zu einer Relaxation der VSMC und somit Dilatation des Gefäßes.

Als möglicher EDHF wird zurzeit unter anderem Hydrogensulfat (H₂S) diskutiert. H₂S modifiziert ATP-sensitive Kaliumkanäle (K_{ATP}) und SK_{Ca} bzw. IK_{Ca} (84).

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie H₂O₂ zählen in einigen Gefäßbetten zu den

EDHF und tragen eventuell über eine Thiol-Oxidation spannungsabhängiger Kaliumkanäle zur Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskelzelle bei (78,112).

Auch EET werden als mögliche Kandidaten für einen EDHF in Schweinekoronararterien diskutiert (40,94). EET bewirken jedoch, anders als es für den typischen EDHF-Signalweg beschrieben ist, eine Öffnung von BK_{Ca} Kanälen der VSMC. Nichtsdestotrotz können sie zur EDHF-vermittelten Hyperpolarisation der VSMC durch einen endothelialen Calciumanstieg oder Aktivierung endothelialer Kaliumkanäle beitragen (20,94). Der Einfluss von EET auf die myoendotheliale Kommunikation über Gap-Junctions ist noch Gegenstand der Forschung.

1.2.2) Endothelabhängige vasokonstringierende Faktoren

1.2.2.1) Endothelin

Im Endothel und VSMC wird das vasokonstriktorisches wirkende Peptid Endothelin-1 (ET-1) synthetisiert. Die Wirkung von ET-1 ist von extrazellulärem Calciumeinstrom durch spannungsabhängige L-Typ Calciumkanäle (Dihydropyridin-Rezeptor) abhängig (26,117). In die ET-1 vermittelte Vasokonstriktion ist die Aktivierung des Rho/Rho-Kinase-Signalweges und damit einhergehende Hemmung der Myosinphosphatase und ein Signalweg über die Aktivierung der Phospholipase C involviert (26).

Es sind zwei G-Protein-gekoppelte Endothelin-Rezeptoren bekannt: ET(A) und ET(B). Beide kommen sowohl in glatten Gefäßmuskel- als auch in Endothelzellen vor (7). Die Vasokonstriktion ist hauptsächlich über ET(A)-Rezeptoren auf den VSMC vermittelt (7). Über den ET(B)-Rezeptor an der Endothelzelle kann ET-1 eine erhöhte NO- und PGI_2 -Bildung und damit eine Vasodilatation auslösen (110).

Die Synthese von ET-1 wird cGMP-abhängig durch den NO-Signalweg gehemmt (13).

1.2.2.2) Urotensin II

Urotensin II ist ein Peptid, welches, abhängig vom Gefäßbett, sowohl vasokonstringierend als auch -dilatierend wirken kann. Es besitzt eine stärkere vasokonstriktorisches Potenz als ET-1 (6). Urotensin II hat eine Bedeutung bei der Entstehung chronischer Hypertonie und wird vor allem im Herzen und der Niere gebildet (98).

1.2.2.3) Thromboxan A_2

Thromboxan A_2 wird sowohl von Endothel- als auch von glatten Gefäßmuskelzellen aus Prostaglandin H_2 synthetisiert. Nach Bindung an den Thromboxan-Rezeptor an der VSMC wirkt Thromboxan A_2 über den RhoA/Rhokinase-Signalweg und Aktivierung der

PLC. Die MLCP wird gehemmt und die MLCK aktiviert, was zu einer Calcium-Sensitivierung mit folgender Kontraktion der VSMC führt (36).

1.3) Der Einfluss der glatten Muskulatur bei der Vasomotorik

Die VSMC kontrahiert bei erhöhter $[Ca^{2+}]_i$. Der Calciumanstieg stimuliert über Bildung von Calcium-Calmodulin-Komplexen die Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins, wodurch Myosin aktiviert wird und zusammen mit Actin zur Kontraktion führt. Auch unabhängig von der Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels kann es durch Calcium-Sensitivierung, wie oben beschrieben, zur Kontraktion kommen (siehe Abbildung 5).

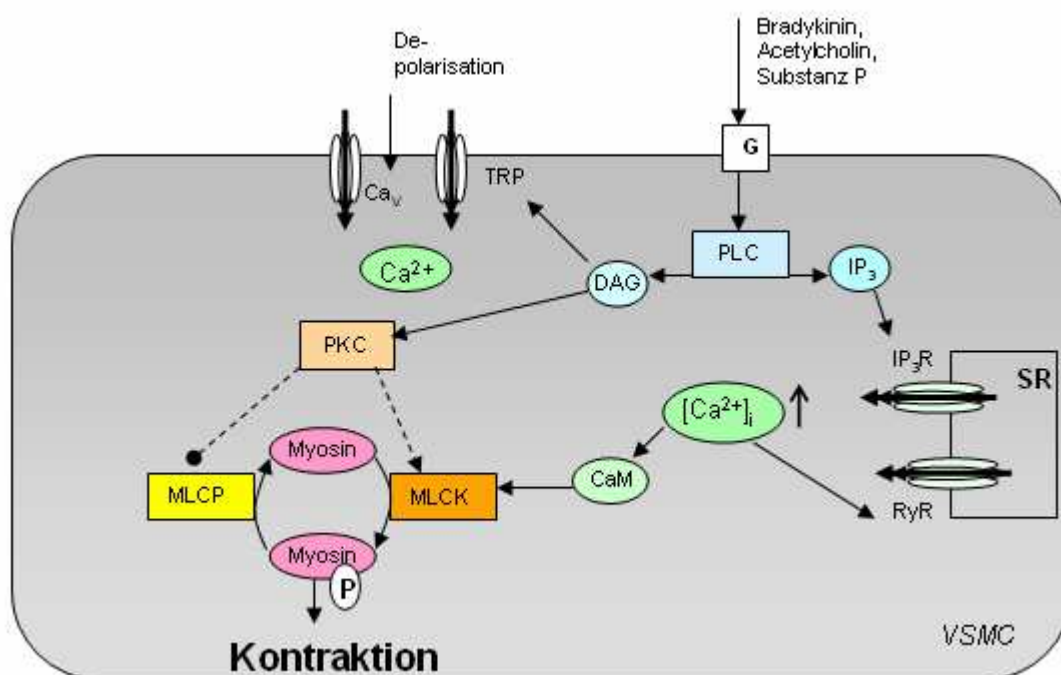


Abbildung 5: Signalweg zur Auslösung einer Kontraktion in der glatten Gefäßmuskelzelle (36)

Durch Bindung diverser Agonisten an das G-Protein (G) wird die PLC aktiviert, die IP₃ und DAG synthetisiert. IP₃ bewirkt über Rezeptorbindung (IP₃R) am sarkoplasmatischen Retikulum (SR) eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. DAG aktiviert TRP-Kanäle, was zu Calciumeinstrom und Membrandepolarisation führt. Durch die Membrandepolarisation öffnen sich Ca_v und die $[Ca^{2+}]_i$ steigt weiter an. Der erhöhte Calciumspiegel aktiviert den Ryanodinrezeptor (RyR) im SR und führt zu weiterem Calciumeinstrom. Außerdem führt erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ zur Bindung von Calcium an Calmodulin. Das so aktivierte Calmodulin (CaM) aktiviert wiederum die MLCK. Mittels Phosphorylierung (P) der leichten Kette des Myosins initiiert die MLCK die Kontraktion der kontraktile Elemente und führt so zur Vasokonstriktion.

DAG aktiviert außerdem die Proteinkinase C (PKC), welche die MLCK aktiviert und ihren Gegenspieler, die MLCP, hemmt. Dadurch kommt es zur Calcium-Sensitivierung und die Kontraktion der VSMC wird gefördert.

Das Calcium wird auf die folgenden Arten aus dem Zytosol der VSMC eliminiert: Bei sehr hohen $[Ca^{2+}]_i$ (> 500 nmol) wird Calcium in die Mitochondrien sequestriert (62).

Außerdem wird das Calcium aktiv über ATP-abhängige Ca^{2+} -Pumpen (Ca^{2+} -ATPasen) in das SR und in den Extrazellularraum gepumpt. Auch durch $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscherpumpen kann Calcium den Intrazellularraum verlassen. Der so bewirkte Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration führt zur Aktivierung der Na^+/K^+ -ATPase, wodurch eine Membranhyperpolarisation erreicht wird. Durch die Hyperpolarisation werden Ca_v geschlossen und ein Stopp des Calciumeinstroms bewirkt.

1.4) Kaliumkanäle im Endothel und in den glatten Gefäßmuskelzellen

Der Kontraktionszustand der VSMC (Gefäßtonus) ist unter anderem vom Ruhemembranpotential abhängig. Für die Modulation des Membranpotentials sind Kaliumkanäle essentiell. Sie sind in 4 Gruppen klassifiziert.

1.4.1) Einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle (K_R)

K_R kommen in EC und VSMC vor und stabilisieren das Ruhemembranpotential. Eine Untergruppe der K_R -Kanäle sind die K_{ATP} , die durch hohe ATP-Konzentrationen inhibiert und durch Substanzen wie Cromakalim (107) aktiviert werden. Die Aktivierung der K_{ATP} -Kanäle hat eine Hyperpolarisation zur Folge, die in der EC zum Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und der damit zusammenhängenden Signalwege (siehe Kapitel 1.2.1) führt (36). In der VSMC bewirkt die Hyperpolarisation ein Absinken der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit nachfolgender Relaxation (15).

1.4.2) Spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_v)

Spannungsabhängige Kaliumkanäle sind vor allem in VSMC exprimiert und werden durch Depolarisation aktiviert. Sie stellen das Ruhemembranpotential wieder her und wirken einer übermäßigen Kontraktion entgegen (36).

1.4.3) Calcium-aktivierte Kaliumkanäle (K_{Ca})

Bei den K_{Ca} existieren 3 Untergruppen: Kanäle mit großer (BK_{Ca}), mittlerer (IK_{Ca}) und kleiner (SK_{Ca}) Leitfähigkeit. BK_{Ca} -Kanäle finden sich vor allem in VSMC und spielen bei der Hyperpolarisation und Relaxation eine Rolle (siehe Abbildung 2). IK_{Ca} und SK_{Ca} Kanäle finden sich in EC vor allem in Regionen, in denen MEGJ lokalisiert sind. Durch intrazellulären Calciumanstieg werden diese Kanäle aktiviert und führen über einen Kaliumausstrom zur Hyperpolarisation der EC. Die Hyperpolarisation wird über MEGJ an die VSMC weitergeleitet und führt in den VSMC zum Schließen von Ca_v -Kanälen und zu einer Relaxation (35).

1.4.4) Tandemporen-Kaliumkanäle (K_{2P})

Tandemporen-Kaliumkanäle sind vor allem für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials verantwortlich und werden auch Hintergrund- oder Zwei-Porendomänen-Kaliumkanäle genannt. Sie wurden erstmals von Ketchum et al. 1995 als TOK1 (Outward-rectifier potassium channel) bei *Saccharomyces cerevisiae* (Hefe) beschrieben (64). Alle bis dato bekannten Kalium-Kanäle hatten eine einzige porenbildende P-Domäne. Die K_{2P} der Wirbeltiere haben 4 Transmembran- und 2 Porendomänen und werden durch vielfältige Signalmoleküle reguliert. Sie liegen, verbunden über Disulfidbrücken, als Homo- oder Heterodimere vor (75,77). Es existieren viele Untergruppen der K_{2P} Kanäle, die zum Teil nach den zuerst entdeckten Eigenschaften der Kanäle und zum Teil nach dem codierenden Gen benannt sind (47). In Mesenterialarterien von Ratten mit einem Durchmesser von 100-200 μm wurde RNA der folgenden K_{2P} Kanäle nachgewiesen: TWIK-1 (Tandem of P domains in Weak Inward rectifier K^+ channel), TASK-1 und-2 (TWIK related Acid-Sensitive K^+ channel), THIK-1 (Tandem-pore-domain halothane-inhibited K^+ channel), TRAAK (TWIK related arachidonic acid stimulated K^+ channel), TREK-1, und-2 (TWIK related K^+ channel) (44).

1.4.4.1) TWIK-Kanäle

Die Aktivität der TWIK-1-Kanäle wird durch Aktivierung der Proteinkinase C gesteigert und durch intrazelluläre Azidose, Chinidin, Chinin und Bariumionen inhibiert (74).

Bryan et al. konnten 2006 TWIK-2 und TRAAK in den glatten Gefäßmuskelzellen von Zerebralarterien der Ratte nachweisen und vermuteten eine Expression von TWIK-2 im Endothel (18).

1.4.4.2) TASK-Kanäle

Leonudakis et al. beschrieben erstmals 1998 den TASK-Kanal im Cerebellum der Ratte und nannten ihn vorerst rTASK. Inzwischen ist dieser Kanal als TASK-1 bekannt (72). Der Kaliumionen Fluss durch TASK-Kanäle ist nicht spannungsabhängig, sondern wird durch den Kaliumgradienten moduliert. Wenn die extrazelluläre Kaliumkonzentration erhöht ist, strömt Kalium durch die TASK-Kanäle in die Zelle und wenn sie erniedrigt ist, kehrt sich der Fluss um (32). Alle TASK-Kanäle haben die Gemeinsamkeit, dass ihr Ionenfluss durch Änderung des extrazellulären pH-Wertes moduliert wird. Der Fluss durch den TASK-1-Kanal wird durch extrazelluläre Azidose, Bupivacain oder Phenytoin inhibiert. Aktivierung der Proteinkinase A reduziert die Expression des Kanals. Allgemeinanästhetika erhöhen die Leitfähigkeit der TASK-Kanäle (72,73).

1.4.4.3) TREK-Kanäle

TREK-1-Kanäle wurden 1996 von Fink et al. entdeckt (38). Diese Kanäle wurden sowohl in EC als auch in VSMC der Mesenterialarterien von Mäusen nachgewiesen (45). Der basale Strom durch TREK-Kanäle ist ein Auswärts-Gleichrichter-Strom und in Ruhe niedriger als der von TASK-Kanälen. Der Kaliumstrom durch TREK-Kanäle wird bei hohen extrazellulären Natrium- und Kaliumkonzentrationen, durch mechanischen Stress, intrazelluläre Azidose, hohe cAMP-Konzentration, hohe Temperatur, volatile Anästhetika, Lipide oder ungesättigte Fettsäuren erhöht und durch Proteinkinase A vermittelte Phosphorylierung inhibiert (38,73,76).

1.5) Hypoxie und ihre Folgen auf zellulärer Ebene

Ischämie und Hypoxie spielen bei vielen pathophysiologischen Prozessen eine große Rolle. Während bei Ischämie, wie sie beim hypovolämischen Schock auftritt, nicht nur die Sauerstoff- sondern auch die Nährstoffversorgung gedrosselt wird, mangelt es dem Gewebe bei Hypoxie, zum Beispiel durch verminderten PO_2 der Atemluft, nur an Sauerstoff.

In den Gefäßbetten des systemischen Kreislaufes verursacht Hypoxie eine Vasodilatation, welche von intaktem Endothel abhängig ist (92). Im Lungenkreislauf kommt es zu einer hypoxischen Vasokonstriktion (39,118).

Akute Hypoxie führt auf zellulärer Ebene zu folgenden Prozessen:

1.) Veränderte NO-Synthese

Die Auswirkungen von Hypoxie auf die endotheliale NO-Synthese werden kontrovers diskutiert und sind abhängig vom Gefäßbett und der Arteriengröße (53).

Für das koronare Gefäßbett konnte gezeigt werden, dass Hypoxie die NO-Synthese und die Menge an eNOS Protein steigert. In kleinen Widerstandsgefäßen ist die Steigerung der NO-Synthese geringer als in größeren Arterien (61). In koronaren EC von Schweinen erhöht Hypoxie die Aktivität der eNOS über eine Interaktion der Phospho-Inositid-3-Kinase (PI3-Kinase) und Proteinkinase B mit Hsp-90 und Phosphorylierung einer aktivierenden Bindungsstelle (Ser1177) der eNOS (24).

Die Datenlage für die EC von Pulmonalarterien ist kontrovers: eine Studie konnte eine verringerte NO-Synthese zeigen (103); eine andere Studie fand eine erhöhte NO-Synthese aufgrund ansteigender Calciumkonzentration bei Hypoxie (48).

Lang anhaltende Hypoxie verringert die Transkription der eNOS (53). In Zellkulturen von humanen Nabelvenen-EC wurde gezeigt, dass anhaltende Hypoxie über 24 Stunden die Genexpression und die Stabilität der eNOS mRNA verringert (80).

2.) HIF-1-Aktivierung

Bei Hypoxie bleibt der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 (HIF-1), der unter normoxischen Bedingungen hydroxyliert und anschließend in Endosomen abgebaut wird, stabil. Er wird unter Hypoxie in den Zellkern transferiert und wirkt dort als Transkriptionsfaktor für Gene der Angiogenese, des Glukosestoffwechsels und einigen weiteren (90,102).

3.) Anaerobe Glykolyse und Laktatanstieg

Die oxidative Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) zu ATP kann bei komplettem Sauerstoffmangel nicht mehr stattfinden. Innerhalb von 8-10 Sekunden (59) wird der noch vorhandene Sauerstoff mobilisiert und verbraucht und der aerobe Zell-Stoffwechsel eingestellt. Der Energiebedarf der Zelle muss dann unter anderem durch die anaerobe Glykolyse gedeckt werden, wobei Laktat anfällt (90).

4.) Ausbildung einer Azidose

Durch Akkumulation von Laktat, Protonen und verminderter Oxidation von NADPH_2 kommt es zur Übersäuerung und zur osmotischen Schwellung der Zelle. Der intrazelluläre pH-Wert fällt bei Ischämie schneller als bei reiner Hypoxie, da bei Ischämie durch den verminderten Blutfluss auch der Abtransport saurer Metabolite gestört ist (115).

5.) Intrazellulärer Natrium- und Calciumanstieg

Der Mangel an ATP hat zur Folge, dass die Fähigkeit zur Kontraktion von Muskelzellen herabgesetzt wird. ATP-abhängige Ionentransporter in der Zellmembran funktionieren nicht mehr. Das führt zu einem intrazellulären Anstieg von Natriumionen, der durch die Stimulation des Na^+/H^+ -Antiporters bei Azidose noch verstärkt wird (67).

Die hohe intrazelluläre Natriumkonzentration verstärkt den Ionenfluss durch den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter, weshalb es sekundär zu einer Calciumüberladung der ischämischen Zellen kommt. In der Endothelzelle triggert der Calciumanstieg die Freisetzung vasodilatierender Substanzen (siehe Kapitel 1.2.1).

6.) Generierung von ROS

ROS und NO liegen unter normalen Bedingungen im Gleichgewicht zueinander in der Zelle vor. Erhöhte NO- oder L-Arginin-Spiegel reduzieren die ROS-Konzentration im Intrazellularraum. Bei Hypoxie verschiebt sich dieses Gleichgewicht zugunsten der ROS (3,9,108). Der Mechanismus der ROS-Erhöhung bei Hypoxie ist noch unklar. Eine Möglichkeit ist, dass vermindert NO gebildet wird, da der NOS der zur NO-Synthese

benötigte molekulare Sauerstoff fehlt. Eine andere Möglichkeit ist, dass Hypoxie an sich die Erhöhung der ROS auslöst und für die ROS-Synthese NO verbraucht wird (108). ROS werden unter physiologischen Bedingungen als Nebenprodukte der Zellatmung in den Mitochondrien gebildet und regulieren wichtige Signalwege in der Zelle. Kommt es zur Hypoxie, werden ROS in den Intrazellularraum freigesetzt. Auch HIF-1 führt zur vermehrten Freisetzung von ROS (115). ROS werden nicht nur bei Hypoxie freigesetzt, sondern spielen auch beim Reperfusionsschaden nach einer Ischämie eine große Rolle (90,115).

2) Fragestellung und Ziel der Arbeit

Die genauen Mechanismen der Vasomotorik unter Hypoxie sind Gegenstand der Forschung und besonders für das intestinale Gefäßbett – im Gegensatz zum koronaren und pulmonalen Stromgebiet - noch weitgehend unbekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Vasomotorik des mesenterialen Gefäßbettes der Maus unter Hypoxie zu untersuchen. Neben der Frage, in welche Richtung sich die Vasomotorik unter Hypoxie verändert und ob diese vom Grad der Hypoxie abhängt, interessieren vor allem mögliche Einflussfaktoren auf die Vasomotorik, wie vom Endothel freigesetztes NO, extrazelluläres Calcium und der zweiporige Kaliumkanal TASK1.

2.1) Wird der Ruhetonus der Arteria mesenterica superior der Maus durch verschiedene Sauerstoffkonzentrationen verändert? Wenn ja, in welche Richtung findet die Veränderung statt? Sind im mesenterialen Gefäßgebiet Spontanoszillationen nachweisbar und werden diese vom Grad der Hypoxie beeinflusst?

Hierzu sollen Segmente der Arteria mesenterica superior der Maus isoliert und mit Pufferlösungen unterschiedlichen hypoxischen Sauerstoffgehaltes perfundiert werden. Der Arteriendurchmesser wird zunächst in Ruhe gemessen. Seine Änderung durch verschiedene Grade der Hypoxie wird aufgezeichnet und ausgewertet. Die Oszillationen sollen in Bezug auf ihr Vorkommen unter Normoxie und unter Hypoxie ausgewertet werden.

2.2) Ist die veränderte Vasomotorik abhängig vom Grad der Hypoxie? Wie stark ist die Veränderung des Ruhetonus im Vergleich zur maximalen Reaktion des Arteriensegmentes?

Es werden mehrere Hypoxie-Stufen verwendet, um zu messen ob eine Abhängigkeit der Vasomotorik vom Grad des Sauerstoffmangels besteht.

Die Hypoxie-induzierte Veränderung des Arteriendurchmessers wird mit der maximal möglichen Arterienkonstriktion, die durch Phenylephrin erreicht wird, und mit der maximal möglichen Arteriendilatation, die durch Nitroprussid-Natrium erreicht wird, verglichen.

2.3) Welche Signalmoleküle sind involviert?

2.3.1) Ist die Vasomotorik calciumabhängig?

Um die Abhängigkeit von Calcium zu messen, werden Versuche in calciumfreier Lösung durchgeführt. In weiteren Versuchen wird der Calciumeinstrom von extrazellulär durch Nickelchlorid (NiCl_2) blockiert.

2.3.2) Welchen Einfluss hat Stickstoffmonoxid?

Der Einfluss von endothelial generiertem Stickstoffmonoxid soll durch Verwendung von $\text{eNOS}^{-/-}$ Mäusen gezeigt werden.

2.4) Inwieweit ist die Reaktion der Arterie durch Tandemporen-Kaliumkanäle, im Speziellen den TASK1-Kanal, geprägt?

TASK1-Kaliumkanäle sind mit verantwortlich für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials. Der Kaliumfluss durch diese Kanäle wird durch metabolische Komponenten, wie Azidose, und durch Allgemeinanästhetika moduliert.

Den Einfluss der TASK1-Kaliumkanäle auf die Vasomotorik unter Hypoxie soll mit Hilfe von $\text{TASK1}^{-/-}$ Mäusen untersucht werden.

3) Material und Methoden

3.1) Verwendete Untersuchungstiere

Für die Entnahmen der Arterien wurden männliche Mäuse des Inzuchtstammes C57BL6J (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, USA) verwendet. Im zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität Gießen wurden sie unter standardisierten Bedingungen bei Raumtemperatur gehalten, hatten einen 12-stündigen Tag/Nacht-Wechsel und freien Zugang zu Futter und Wasser.

Die Versuche wurden mit Genehmigung der Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums Gießen durchgeführt (Geschäftszeichen V 54 – 19 c 20/15 c GI 20/26, 27. Mai 2008).

3.2) Versuchsvorbereitungen und -aufbau

3.2.1) Vorbereitungen

Am Vortag des Versuches wurden alle Schläuche des Versuchsstandes für 20 Minuten mit Wasserstoffperoxid und danach mit 2 Litern destilliertem Wasser gespült, um mögliche Kontaminationen zu vermeiden.

Zusätzlich wurden die Schläuche und Verbindungsstücke auf Verschleiß und Leckage überprüft und die Glaskanülen so justiert, dass sie sich exakt gegenüber standen.

Vor Beginn jedes Versuches wurde das Schlauchsystem mit Tyrode-Lösung von der Firma Genaxxon bioscience GmbH mit Sitz in Ulm durchgespült. Einem Liter Tyrode-Lösung wurden vor der normoxischen Begasung noch 7 ml einmolarer NaHCO_3^- -Lösung zugefügt.

Tabelle 1: Zusammensetzung Tyrode-Lösung

Natriumchlorid	117 mM
Kaliumchlorid	4,5 mM
Magnesiumchlorid	1 mM
Natriumbicarbonat	23 mM
Glukose	11 mM
Calciumchlorid	2,5 mM

3.2.2) Präparation der Arteria mesenterica

Die Tötung der Mäuse erfolgte durch Genickbruch. Sofort nach der Tötung wurde die Bauchhöhle eröffnet, der gesamte Darm entnommen und in gekühlten DPBS-Puffer (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, GIBCO, Invitrogen Corporation, California, USA) gelegt (siehe Abbildung 6).

Zur raschen Präparation der Arteria mesenterica superior wurde der Darm sternförmig auf einer Pyrex® Bottom Schale aufgesteckt (siehe Abbildung 6) und in gekühltem DPBS-Puffer gelagert. Der DPBS-Puffer hatte eine Temperatur von 4-8°C und wurde auf einen pH von 7,4 eingestellt.

Unter dem Mikroskop (Motic SMZ-140-N2GG; Motic Deutschland GmbH, Wetzlar) wurden alle weiteren Präparationen vorgenommen. Hierfür wurden spezielle Pinzetten (Dumont #5SF) und Federscherchen (Student Iris Scissor bzw. Surgical Scissor) der Firma Fine Scientific Tools GmbH, Heidelberg benutzt.

Zunächst wurde ein Segment zweiter Ordnung der Arteria mesenterica superior freigelegt. Es konnten nur Segmente verwendet werden, von denen keine kleineren Seitenästchen abgingen und deren Wand nicht verletzt war. Ein geeignetes Segment wurde vorsichtig und ohne Zug von der benachbarten Vene und dem Fettgewebe komplett befreit. Im letzten Schritt wurde die Adventitia vorsichtig abgezogen. Bei der Präparation wurde die Arterie nicht berührt.

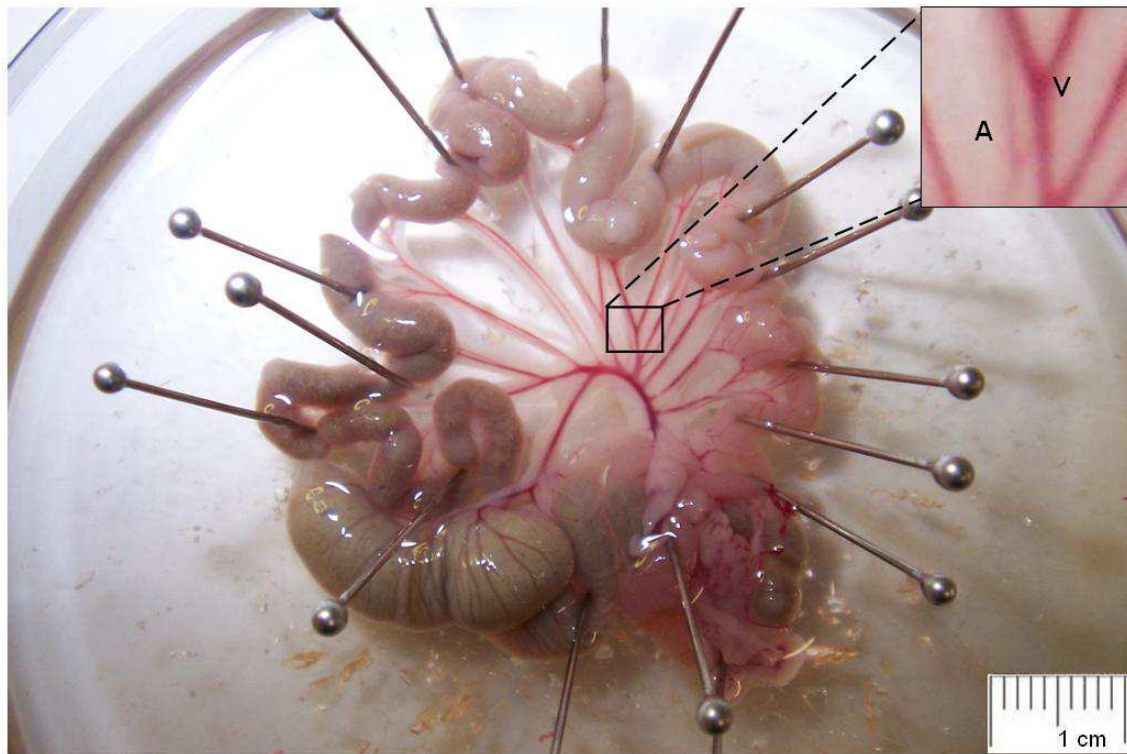


Abbildung 6: Sternförmig aufgesteckter Darm der Maus mit der Arteria und Vena mesenterica superior in der Mitte vor Beginn der Präparation. Die Venen (V) unterscheiden sich von den Arterien (A) dadurch, dass sie stärker mit Blut gefüllt und somit deutlicher zu sehen sind.

3.2.3) Aufbau des Messstandes

Nach Freipräparation der Arterie wurde unter dem Mikroskop ein 2-4 mm langes Segment zweiter Ordnung der Arterie abgeschnitten und in die Messkammer (siehe Abbildung 8) verbracht. In der Messkammer („single vessel chamber, CH/1“; Firma Living Systems Instrumentation, Burlington, USA) waren zwei gegenüberliegende sehr feine Glaskanülen (Glass Cannula, tip diameter 100 to 125; Firma Living Systems Instrumentation, Burlington, USA; siehe Abbildung 8) angebracht. Das Arteriensegment wurde nun zuerst über eine der Glaskanülen gezogen, so dass die Glaskanüle circa einen Millimeter in das Gefäßlumen ragte. Dann erfolgte die Fixierung des Arteriensegmentes auf der Kanüle mittels zweier Mikroknoten. Auf der gegenüberliegenden Kanüle wurde das andere Ende des Arteriensegmentes auf die gleiche Weise fixiert. Die Teile des Arteriensegmentes, an denen es durch Pinzetten berührt werden musste, um es zu fixieren, lagen hinter den Knoten und wurden nicht perfundiert.

Um die Qualität des Arteriensegmentes und der Fixierung zu überprüfen, wurde das Arteriensegment durch die druckgesteuerte Peristaltikpumpe (Pressure Servo System PS/200/Q; Firma Living Systems Instrumentation, Burlington, USA) perfundiert. Arteriensegmente, die nicht richtig befestigt oder undicht waren, konnten so identifiziert und neu fixiert oder ausgetauscht werden.

Bei der ersten Perfusion entfaltete sich das intakte Arteriensegment und es bestand eine geschlossene Zirkulation durch das Arteriensegment (im Folgenden „innerer Kreislauf“).

Der Perfusionsdruck wurde am Druckregler auf 40-50 mmHg eingestellt und lag damit nahe an den physiologischen Druckverhältnissen. Die am Zu- und Abfluss des inneren Kreislaufs angebrachten Druckaufnehmer maßen den Perfusionsdruck, den ein analoger Schreiber (Servocoder SR 2611; Firma Graphtec, Tokyo, Japan) kontinuierlich in grüner Farbe aufzeichnete (siehe Abbildung 7).

Die Messkammer (siehe Abbildung 8) mit dem fixierten Arteriensegment wurde nun auf ihrer Halterung auf dem Durchlichtmikroskop (Axiovert 35; Carl Zeiss AG, Oberkochen) angebracht und die Schläuche zur Perfusion des Organbades in der Messkammer wurden angeschlossen. Sie führten zu einer Pumpe (Masterflex-Pumpe „EasyLoad II“; Cole-Parmer Instrument, Chicago, USA) die einen konstanten Fluss von 20 ml/Minute lieferte. Die Schläuche („Nalgene 50 Platinum-Cored Silicone Tubing“, Fisher Scientific GmbH, Schwerte) zur Perfusion des Organbades und zur Perfusion des Arteriensegmentes (Tygon R3603; Novodirect GmbH, Kehl) waren laut Herstellerangaben gasundurchlässig.

Die verwendeten Lösungen standen in Glasflaschen im Wasserbad (Haake P5; Haake Messtechnik, Karlsruhe), welches von einem Thermostat (Haake DC-10; Haake Messtechnik, Karlsruhe) kontinuierlich auf 37°C erwärmt wurde.

Die Versuchslösungen wurden während der gesamten Versuchszeit mit dem gewählten Gas auf die gewünschte Sauerstoffkonzentration äquillibriert. Die verwendeten Gase wurden von der Firma Air Liquide Deutschland GmbH mit Sitz in Düsseldorf geliefert.

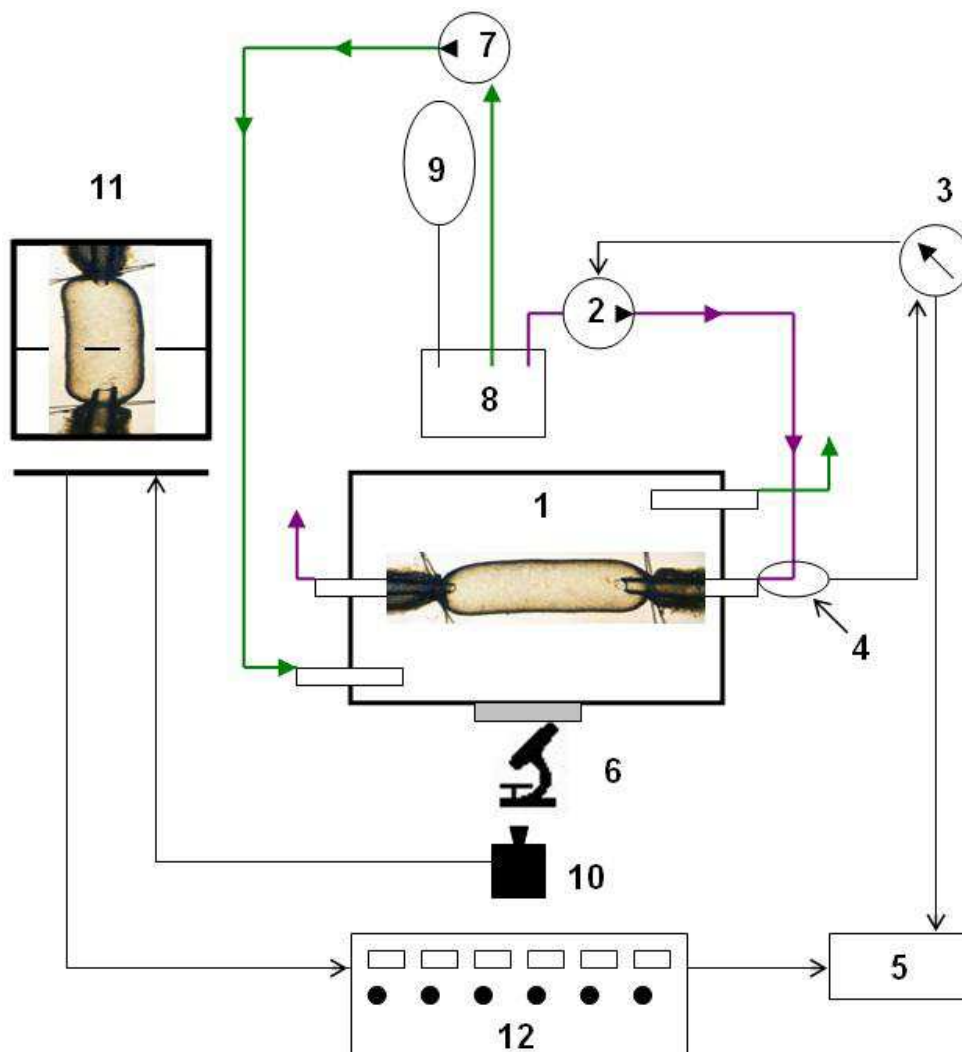


Abbildung 7: Schema des Messstandes

1: Messkammer mit dem fertig präparierten Arteriensegment zwischen den Glaskanülen (siehe auch Abbildung 8); 2: druckgesteuerte Peristaltikpumpe zur Perfusion des Arteriensegmentes (Flussrichtung: lila Pfeile); 3: Druckregler zur Steuerung des Perfusionsdruckes des Arteriensegmentes; 4: Druckaufnehmer zur Messung des Perfusionsdruckes; 5: analoger Schreiber zur kontinuierlichen Aufzeichnung von Durchmesser und Druck; 6: Durchlichtmikroskop, auf dem die Messkammer fixiert ist; 7: Masterflex-Pumpe für die Perfusion des Organbades (Flussrichtung: grüne Pfeile); 8: Begaste Lösung im Wasserbad; 9: Gasflasche zur Begasung der verwendeten Lösung; 10: Kamera; 11: Bildschirm mit Messlinien zur Messung des Arterien Durchmessers; 12: Messgerät, an dem die Messlinien justiert werden und der aktuelle Durchmesserwert angezeigt wird.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Gase in den Flaschen

	O ₂	CO ₂	N ₂
"Normoxie"	21%	5,3%	73,7%
"Hypoxie"	5%	5,3%	89,7%
"Anoxie"	0%	5,3%	94,7%

Nach Einsetzen des Arteriensegmentes wurde der Versuch in der mit Hilfe eines Plastikdeckels geschlossenen Kammer durchgeführt.

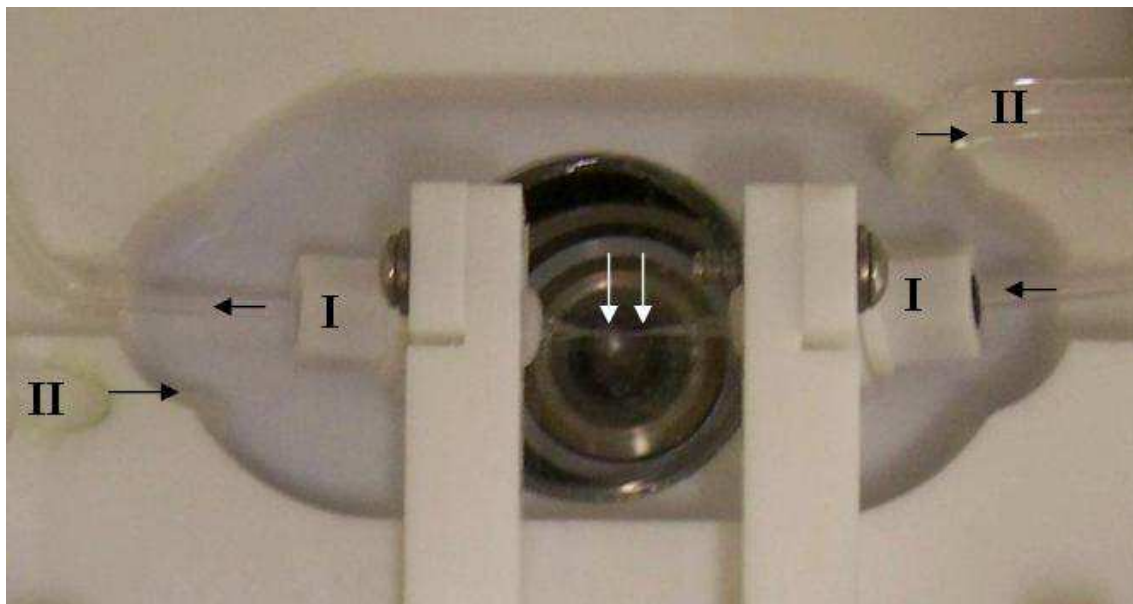


Abbildung 8: Messkammer auf dem Durchlichtmikroskop

„Innerer Kreislauf“ (I) über den das Arteriensegment perfundiert wurde und „äußerer Kreislauf“ (II) zur Perfusion der Messkammer mit einem Fluss von 20 ml/min. Die schwarzen Pfeile zeigen die Flussrichtung an, die weißen Pfeile zeigen auf die Glaskanülen, auf denen das Arteriensegment befestigt wurde. Im Hintergrund der Glaskanülen ist die Linse des Mikroskops zu sehen.

3.3) Messung des Arteriendurchmessers

Der Durchmesser des Arteriensegmentes wurde wie folgt gemessen: Die auf dem Durchlichtmikroskop fixierte Messkammer wurde von einer auf dem Mikroskop angebrachten Kamera („TC 7014 X“; Burle Industries Inc., Lancaster, USA) gefilmt und die von der Kamera aufgenommenen Bilder auf einen Bildschirm (TC 1112 X; Burle Industries Inc., Lancaster, USA) übertragen.

Auf diesem Bildschirm waren das Arteriensegment in der Messkammer und Messlinien zu sehen. Die Messlinien konnten am Messgerät („Video Dimension Analyzer“, Model VM-2; Firma Living Systems Instrumentation, Burlington, USA) justiert werden, um den Gefäßdurchmesser exakt zu messen (siehe Abbildung 7). Der gemessene

Innendurchmesser wurde auf dem Messgerät digital als numerischer Wert angezeigt und mittels des analogen Schreibers in roter Farbe kontinuierlich aufgezeichnet. Der gemessene Durchmesser der Arteriensegmente von Wildtyp-Mäusen in normoxischer calciumhaltiger Tyrode-Lösung ohne Zusätze variierte zwischen 109 und 172 μm .

3.3.1) Zeitlicher Versuchsablauf

Der zeitliche Ablauf und die Rahmenbedingungen waren bei allen Versuchen gleich (siehe Abbildung 9). Zu Beginn stand immer die einstündige Kalibrierungszeit, in der die Sauerstoffkonzentration der Lösungen konstant bei 21% gehalten wurde. Die Temperatur der Tyrode-Lösung betrug durchgehend 37°C und der Druck war konstant. Der pH-Wert der Spüllösungen wurde vor Beginn der Kalibrierungszeit und nach dem Versuch gemessen, er lag bei 7,4.

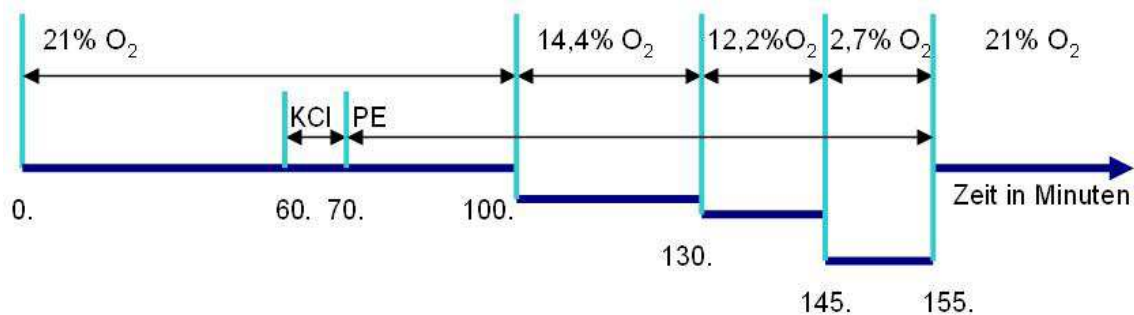


Abbildung 9: Zeitlicher Versuchsablauf

Die Aufzeichnung der Messwerte begann nach den ersten 30 Minuten der Kalibrierungszeit. Nach der 60-minütigen Kalibrierungszeit schloss sich der Vitalitätstest des Arteriensegmentes mit 120 mM Kaliumchlorid (KCl) an. In Vorversuchen stellte sich heraus, dass Kaliumchlorid zur Schädigung des Arteriensegmentes führt, wenn das Arteriensegment damit perfundiert wird. Deshalb wurde das Kaliumchlorid nur dem Organbad zugegeben. Nach dem Vitalitätstest wurde das Arteriensegment für den gesamten Versuch mit Phenylephrin 10^{-6} (PE; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim), einem α_1 -Agonisten, präkonstringiert. PE wurde nur der Perfusionslösung zugegeben.

Der Durchmesser, den das Arteriensegment nach 100 Minuten hatte, diente als Ausgangswert für spätere Berechnungen der Vasomotorik.

Die Sauerstoffkonzentration der Perfusionslösung und des Organbades wurden ab Minute 100 stufenweise gesenkt, die Rahmenbedingungen blieben konstant.

Nach der Kalibrierungszeit wurden mit der jeweiligen Versuchslösung beide Kreisläufe 30 Minuten normoxisch, 30 Minuten hypoxisch mit 14,4% Sauerstoff und 15 Minuten hypoxisch mit 12,2% Sauerstoff perfundiert. Zur Verstärkung der Hypoxie wurde Natriumdithionat, ein Sauerstoffscavenger, dazugegeben. Damit ließ sich eine Sauerstoffkonzentration von 2,7% in der Messkammer erreichen. Mit Hilfe eines Membranoxygenators (Firma Living Systems Instrumentation, Burlington, USA) und Natriumdithionat konnte eine Sauerstoffkonzentration von 0% im Organbad der

Messkammer erreicht werden.

3.3.2) Vorversuche

Um die Daten der verschiedenen Versuchsreihen auswerten und in Relation zur maximal möglichen Kontraktion beziehungsweise Dilatation setzen zu können, waren folgende Vorversuche notwendig.

3.3.2.1) Ermittlung der maximalen Konstriktion und Dilatation

Für die Ermittlung der maximalen Konstriktion wurden Vorversuche mit Phenylephrin (PE) etabliert (siehe Abbildung 10). Die Präparation und Ermittlung des Ausgangsdurchmessers der Arteriensegmente erfolgte wie oben beschrieben.

Darauf folgte die Perfusion mit normoxisch begaster Tyrode-Lösung und aufsteigenden Konzentrationen von PE beginnend bei 10^{-8} Mol/l und alle 30 Minuten um das Zehnfache steigend. Der bei der maximalen PE-Konzentration von 10^{-3} gemessene Gefäßdurchmesser wurde in Relation zum Ausgangswert gesetzt. Dabei ergab sich eine maximale Konstriktion des Arteriensegmentes um 9,666% des Ausgangswertes.

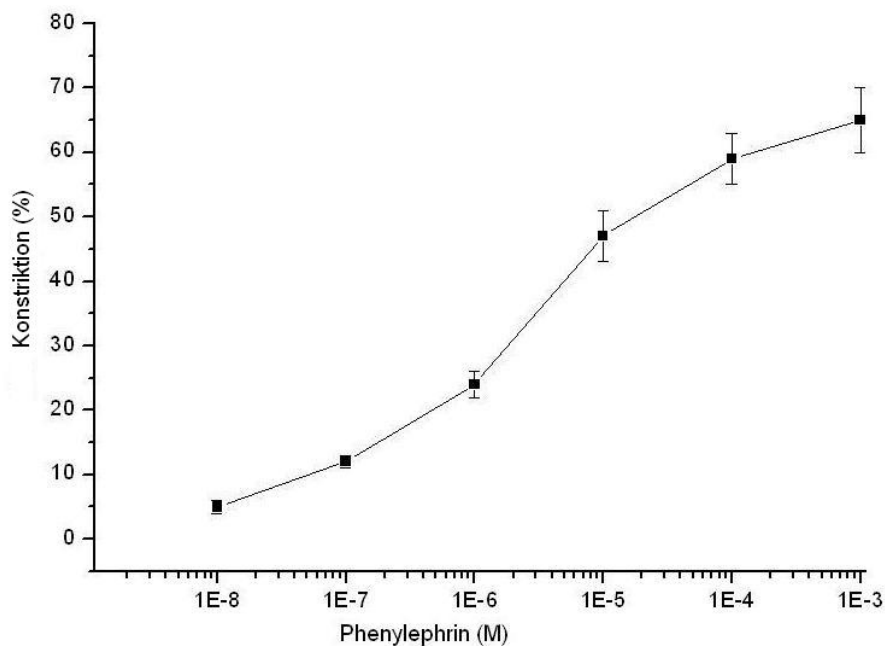


Abbildung 10: Ermittlung der maximalen Konstriktion mit Phenylephrin

Um die maximale Dilatation zu ermitteln wurde unter Präkonstriktion mit PE Nitroprussid-Natrium (Schwarz AG, Monheim) in aufsteigender Konzentration zur Versuchslösung gegeben (siehe Abbildung 11). Dem lichtbedingten Zerfall des Nitroprussid-Natriums wurde durch Abschirmung sämtlicher Schläuche und Verbindungsstücke mit Aluminium-Folie vorgebeugt.

Der zeitliche Versuchsablauf entsprach dem bei der Ermittlung der maximalen Konstriktion mit PE. Die Konzentration an Nitroprussid-Natrium wurde von 10^{-9} bis 10^{-4} gesteigert. Die maximale Dilatation wurde bei einer Nitroprussid-Natriumkonzentration von 10^{-4} erreicht und betrug 3,74% des Ausgangswertes.

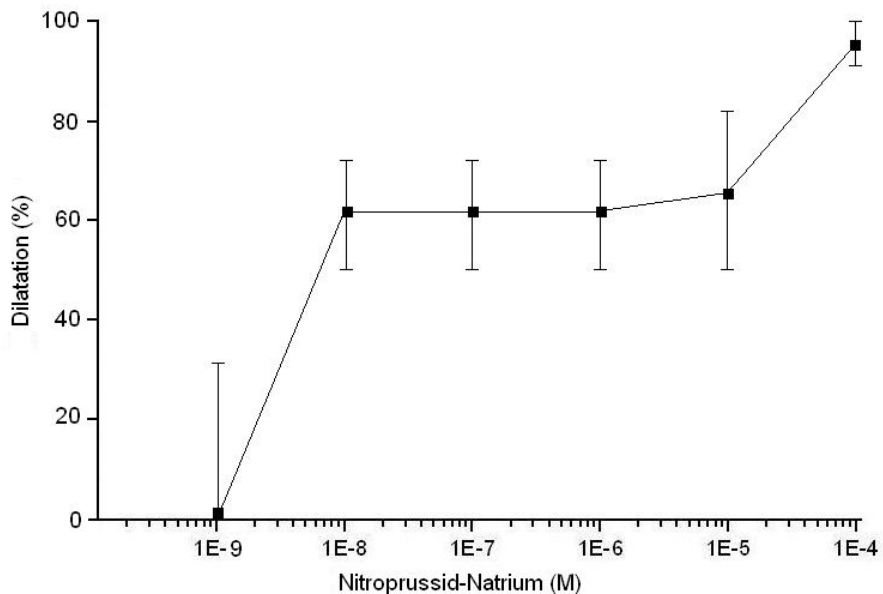


Abbildung 11: Ermittlung der maximalen Dilatation mit Nitroprussid-Natrium unter Präkonstriktion mit PE. Bereits mit einer Konzentration von 10^{-8} wurde eine Dilatation von circa 60 Prozent der maximalen Dilatation erreicht.

3.3.2.2) Ermittlung des Sauerstoffpartialdruckes in der Messkammer

Die Messung des Sauerstoffpartialdruckes in den Lösungen erfolgte mit einer Sauerstoffsonde (Oxygen Microsensor; flat broken tip) der Firma Precision Sensing GmbH, Regensburg.

Zunächst wurde der Sauerstoffpartialdruck der Lösungen vor der Applikation in das Schlauchsystem gemessen. Hierzu wurde die Tyrode-Lösung in kleinen Glasbechern für jeweils 20 Minuten mit verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen begast. Der Sauerstoffpartialdruck der Tyrode-Lösung in den Glasbechern betrug nach Begasung mit 21% Sauerstoff circa 160 Torr (entspricht 21,05% O_2), nach Begasung mit 5% Sauerstoff circa 39 Torr (entspricht 5,13% O_2) und nach Begasung mit 0% Sauerstoff mit bzw. ohne Natriumdithionat 0-3 Torr (entspricht 0% O_2). Die Sauerstoffpartialdrücke der Lösungen in den kleinen Glasbechern entsprachen nach dem Begasen fast exakt den Sauerstoffkonzentrationen der Gasgemische aus den Gasflaschen. Dieses Ergebnis lässt sich auf die für die Versuche verwendeten Lösungen für die Perfusion und das Organbad übertragen, da sie auf die gleiche Weise begast wurden.

Da zwischen begasteter Lösung im Wärmebad und der Messkammer das

Schlauchsystem mit diversen Verbindungsstücken lag, wurde zusätzlich der Sauerstoffpartialdruck in der Kammer in unmittelbarer Nähe des Arteriensegmentes gemessen (siehe Abbildung 12).

Zuerst wurde die Kammer mit der normoxisch begasten, danach mit der hypoxisch begasten, und zum Schluss mit der anoxisch begasten Tyrode-Lösung perfundiert. Wie in den folgenden Versuchsreihen auch, wurde 1 mM Natriumdithionat als Sauerstoffscavenger zur Intensivierung der Hypoxie hinzugegeben.

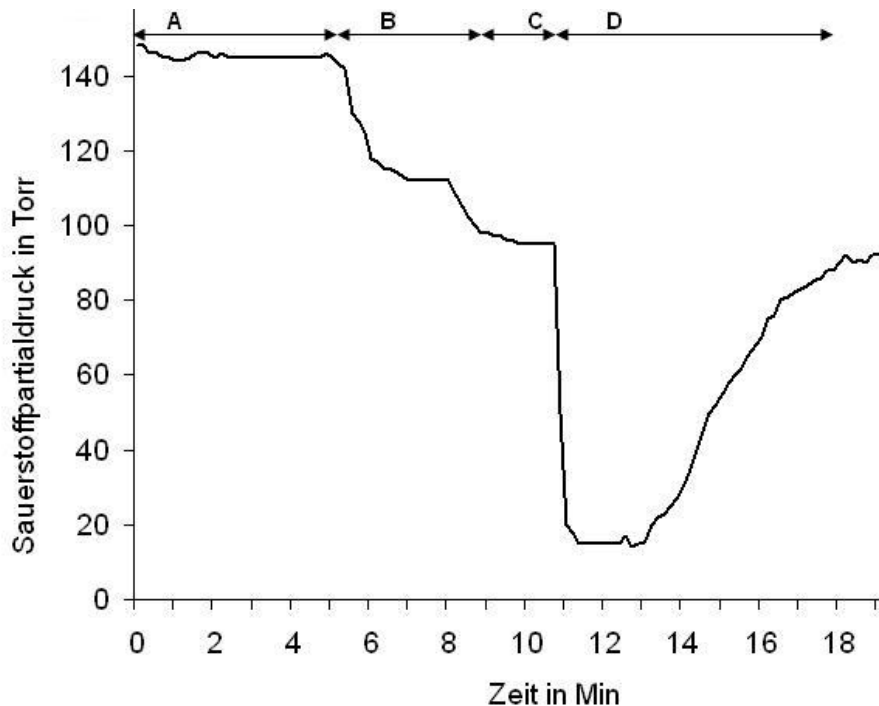


Abbildung 12: Sauerstoffpartialdruck in der Messkammer bei Perfusion mit unterschiedlich begasten Lösungen.

Der Sauerstoffpartialdruck in der Kammer war bei normoxischer Begasung (21% O₂; **A**) circa 150 Torr, das entspricht 19,7% Sauerstoff. Bei hypoxischer Begasung (5% O₂; **B**) wurden circa 110 Torr (entspricht 14,4% Sauerstoff) und bei anoxischer Begasung (0% O₂; **C**) ca. 93 Torr (entspricht 12,2% Sauerstoff) in der Kammer gemessen. Durch Zugabe von Natriumdithionat während anoxischer Begasung (**D**) sank der Sauerstoffpartialdruck auf 21 Torr (entspricht 2,7% Sauerstoff). Dieser niedrige Sauerstoffpartialdruck blieb für circa 2 Minuten konstant und stieg dann auf 90 Torr (11,8% Sauerstoff) an. Dieser Anstieg ist vermutlich auf minimale Leckagen des Schlauchsystems, der Kupplungsstücke und eine Erschöpfung der Kapazität des Natriumdithionats zurückzuführen.

Da die gemessenen Sauerstoffpartialdrücke in der Kammer nicht den erwarteten Werten entsprachen, wurde für eine zweite Messung ein Membranoxygenator der Firma Living Systems Instrumentation, Burlington, USA eingesetzt (siehe Abbildung 13). Er wurde an das Ende des Schlauchsystems, direkt vor den Eingang des äußeren Kreislaufs in die Kammer zwischengeschaltet. Der Membranoxygenator wurde mit dem jeweils verwendeten Gasgemisch mit einem Fluss von 0,5 l/Minute begast.

Die Messung in der Kammer wurde genauso durchgeführt wie oben beschrieben.

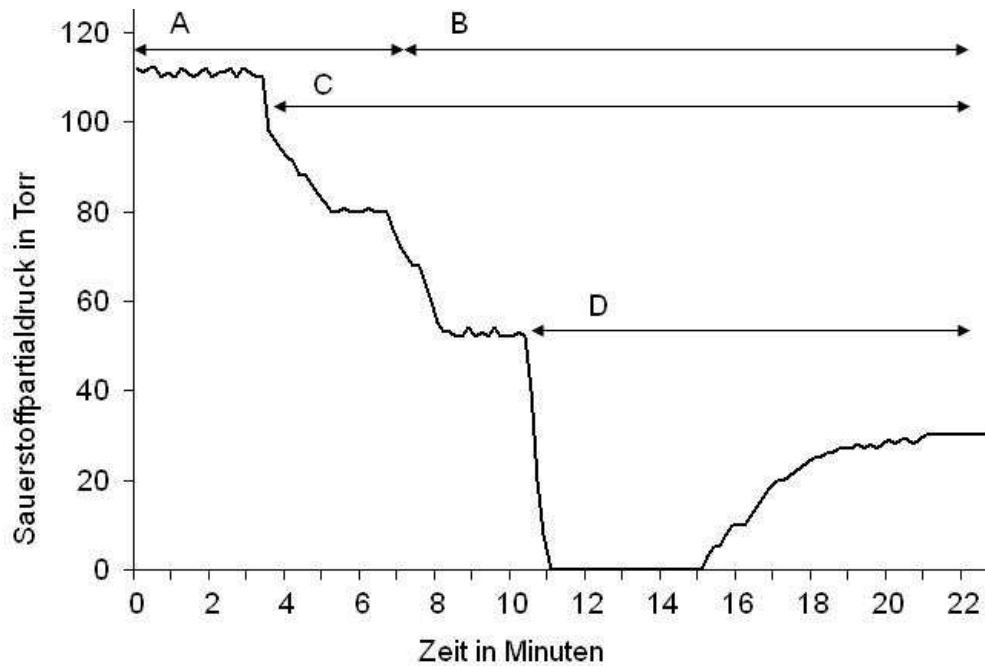


Abbildung 13: Sauerstoffpartialdruck in der Kammer unter Verwendung des Membranoxygenators bei Perfusion mit unterschiedlich begasten Lösungen.

Nach hypoxischer Begasung (5% O_2) wurden in der Kammer ca. 110 Torr (14,4% O_2) Sauerstoffpartialdruck gemessen (A). Durch Zwischenschalten des Membranoxygenators (C) sank der Sauerstoffpartialdruck in der Kammer auf ca. 80 Torr (10,5% O_2). Bei anoxischer Begasung (0% O_2 ; B) und Verwendung des Membranoxygenators wurden in der Kammer ca. 52 Torr (6,8% O_2) und durch Zugabe von Natriumdithionat (D) ca. 0 Torr (0% O_2) Sauerstoffpartialdruck erreicht.

Der Sauerstoffpartialdruck von 0 Torr in der Messkammer blieb für circa 4 Minuten konstant und stieg dann langsam auf 30 Torr (4% O_2) an.

3.3.3) Versuchsreihen

Insgesamt wurden fünf verschiedene Versuchsreihen durchgeführt.

Als Kontrollgruppe dienten zehn Versuche mit Wildtyp-Mäusen, bei denen bikarbonat-gepufferte Tyrode-Lösung verwendet wurde. Die Sauerstoffkonzentration wurde von 21% bis auf 0% gesenkt.

Die folgende Versuchsreihe wurde mit Wildtyp-Mäusen, im Gegensatz zur Kontrollgruppe jedoch mit calciumfreier Lösung durchgeführt. Diese Lösung wurde vor jedem Versuch frisch angesetzt. Statt dem in der normalen Tyrode-Lösung vorhandenem Calciumchlorid wurde hier 1 mM EGTA (Ethylenglykol-bis(amino-ethylether)-N,N,N'-tetraessigsäure, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) eingesetzt. Die Sauerstoffkonzentrationen wurden von 21% bis 2,7% variiert.

Tabelle 3: Zusammensetzung der calciumfreien Tyrode-Lösung

Natriumchlorid	117 mM
Kaliumchlorid	4,5 mM
Magnesiumchlorid	1 mM
Natriumbicarbonat	23 mM
Glukose	11 mM
EGTA	1 mM

In der dritten Versuchsreihe wurde 2,5 mM NiCl_2 zur fertigen Tyrode-Lösung gegeben, um den Calciumeinstrom von extrazellulär zu blockieren. Wie in der Kontrollgruppe wurden auch hier Wildtyp-Mäuse verwendet.

Der Einfluss des Endothels auf die Vasomotorik wurde in einer weiteren Versuchsreihe untersucht. Bei Ratten ist zur mechanischen Entfernung der Endothelzellschicht von Mesenterialarterien das Auffädeln des Arteriensegmentes auf ein Pferdehaar etabliert (51). Diese Methode führte bei den Mesenterialarteriensegmenten der Mäuse jedoch dazu, dass das Arteriensegment nach dieser Prozedur nicht mehr vital war. Deshalb schloss sich nach den Versuchsreihen mit Wildtyp-Mäusen eine Versuchsreihe mit Mäusen an, bei denen das Gen für die eNOS ausgeschaltet war (Stamm B6.129P2 $\text{NOS3}^{\text{tm1Unc}/J}$) an. Die $\text{eNOS}^{-/-}$ Mäuse wurden von Charles River Laboratories, Inc, Wilmington, USA geliefert.

Für eine weitere Versuchsreihe wurden $\text{TASK1}^{-/-}$ Mäuse verwendet, um den Einfluss dieses Kaliumkanals auf die hypoxie-induzierte Vasomotorik zu untersuchen. Die $\text{TASK1}^{-/-}$ Mäuse wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Prof. Kummer aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen bereitgestellt. Bei diesen beiden Versuchsreihen wurde Tyrode-Lösung verwendet und die Sauerstoffkonzentrationen von 21% bis auf 2,7% gesenkt.

3.4) Oszillationen

Bei fast allen Versuchen oszillierte der Gefäßdurchmesser. Dieses Phänomen ist schon lange bekannt und wurde für verschiedene Gefäßgebiete (1), als auch für das mesenteriale Gefäßbett der Ratte (12,95), beschrieben.

Die Frequenzen und Amplituden der Oszillation der ausgewerteten Versuche wurden anhand der Daten des Schreibers näherungsweise ermittelt.

Die Durchmesserschwankungen wurden für die Auswertung in Relation zum aktuellen Durchmesser bei der jeweiligen Sauerstoffkonzentration mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Amplitude der Durchmesserschwankung } [\mu\text{m}]}{\text{aktueller Durchmesser } [\mu\text{m}]} \times 100$$

Um Artefakte durch die Peristaltikpumpe auszuschließen, wurden auch die Frequenzen und Amplituden der Druckaufzeichnung gemessen. Druckschwankungen, die durch die Peristaltikpumpe ausgelöst wurden, führten nicht zu Schwankungen des Gefäßdurchmessers.

Weiterhin wurde gemessen, wie viel Prozent der Versuchszeit ohne Oszillationen waren. Das Kriterium war, dass in den Zeiten ohne Oszillationen die Schreiberlinie entweder maximal einen Millimeter dick war oder es gut voneinander abgrenzbare Ausschläge gab. Aus diesen Werten wurde errechnet, wie viel Prozent der Zeit, in der mit der entsprechenden Lösung perfundiert wurde, das Arteriensegment oszilliert hat.

3.5) Auswahl der Versuche zur Auswertung

Die Auswahl der hier beschriebenen Versuche erfolgte nach ihrer Auswertbarkeit. Versuche, bei denen Luftblasen im Arteriensegment kumulierten, wurden nicht ausgewertet, da durch die Luftblasen sehr große Schwankungen des Durchmessers und des Drucks entstanden. Weitere Versuche, die nicht ausgewertet wurden, waren solche, die nicht vollständig durchgeführt werden konnten. Ursächlich waren Unregelmäßigkeiten des Druckes durch Fehler an der Peristaltikpumpe, Abrutschen eines Schlauches (dadurch artifizielle Dilatation) und Luftblasen außerhalb des Arteriensegmentes, die nicht mehr wegzuspülen waren.

3.6) Statistik und Auswertung der Messwerte

Die ermittelten Durchmesserwerte bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen wurden mit folgender Formel in „% des Ausgangsdurchmessers“ umgerechnet, damit die Messwerte untereinander vergleichbar wurden.

$$\frac{\text{Durchmesser bei „Hypoxie“ } [\mu\text{m}]}{\text{Durchmesser bei „Normoxie“ } [\mu\text{m}] - 1} \times 100$$

Weiterhin wurde mit der folgenden Formel errechnet, wie stark die Reaktion des Arteriensegmentes in Relation zu der in den Vorversuchen ermittelten maximalen Konstriktion (durch 1 mM Phenylephrin) beziehungsweise der maximalen Dilatation (durch 0,1 mM Nitroprussid-Natrium) war.

$$\frac{\text{„\% des Ausgangsdurchmessers“}}{\text{maximale Konstriktion bzw. Dilatation [\%]}} \times 100$$

Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism 5 errechnet. Abhängig von der Normalverteilung wurde der Student t-Test für gepaarte Stichproben beziehungsweise der Wilcoxon-Rangsummen-Test verwendet.

Zum Vergleich der Mittelwerte verschiedener Gruppen miteinander wurde abhängig von der Normalverteilung der One-Way-ANOVA-Test beziehungsweise der Kruskal-Wallis-Test verwendet.

Für alle statistischen Berechnungen gilt das Signifikanzniveau $p < 0,05$.

Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben.

4) Ergebnisse

4.1) Hypoxie-induzierte Vasomotorik in der Kontrollgruppe

Der Ruhetonus der Arteria mesenterica superior der Maus veränderte sich unter hypoxischen Bedingungen in zwei Richtungen: eine Gruppe von Arteriensegmenten reagierte mit Dilatation und die andere Gruppe mit Konstriktion. Der prozentuale Anteil der dilatierenden Arteriensegmente an der gesamten Kontrollgruppe (Wildtyp-Mäuse und calciumhaltige Tyrode-Lösung; n=10) wurde mit sinkender Sauerstoffkonzentration größer (siehe Abbildung 14).

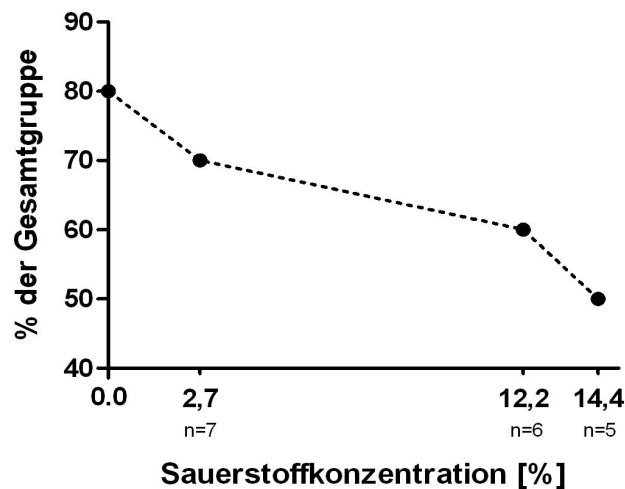


Abbildung 14: Prozentualer Anteil der dilatierenden Arteriensegmente, von der Gesamtzahl (n=10) der untersuchten Arteriensegmente in der Kontrollgruppe (Y-Achse) in Abhängigkeit von der prozentualen Sauerstoffkonzentration (X-Achse). Die Verbindung durch die gestrichelte Linie soll die Abhängigkeit der Dilatationshäufigkeit von der hypoxischen Sauerstoffkonzentration verdeutlichen.

Die Intensität der Dilatation sank in der Kontrollgruppe mit abnehmender Sauerstoffkonzentration. Während bei 14,4% Sauerstoff durchschnittlich eine Dilatation um $1,96\% \pm 0,55$ (Mittelwert \pm SEM; n=5/10; p=0,0652) des Ausgangsdurchmessers bei Normoxie erreicht wurde, war es bei 0% Sauerstoffgehalt nur noch $0,68\% \pm 0,13$ (n=4/5; p=0,125) des Ausgangsdurchmessers (siehe Tabelle 4A). In der Gruppe der Arteriensegmente, die mit Dilatation reagierten, war die Dilatation bei den Sauerstoffkonzentrationen von 12,2% und 2,7% signifikant unterschiedlich zum Ausgangsdurchmesser (siehe Abbildung 15).

Der prozentuale Anteil der Arteriensegmente, die mit Konstriktion reagierten, nahm mit sinkender Sauerstoffkonzentration von 50 % bei 14,4% Sauerstoff auf 10% bei Anoxie ab. Auch die Intensität der Konstriktionen nahm mit sinkendem Sauerstoffgehalt ab. Bei einem Sauerstoffgehalt von 14,4% konstringierten die Arteriensegmente signifikant um

0,79% \pm 0,054 des Ausgangsdurchmessers (n=5/10; p<0,001) und bei 0% Sauerstoff nur um 0,6% des Ausgangsdurchmessers bei Normoxie (n=1/5; siehe Tabelle 4A und Abbildung 15).

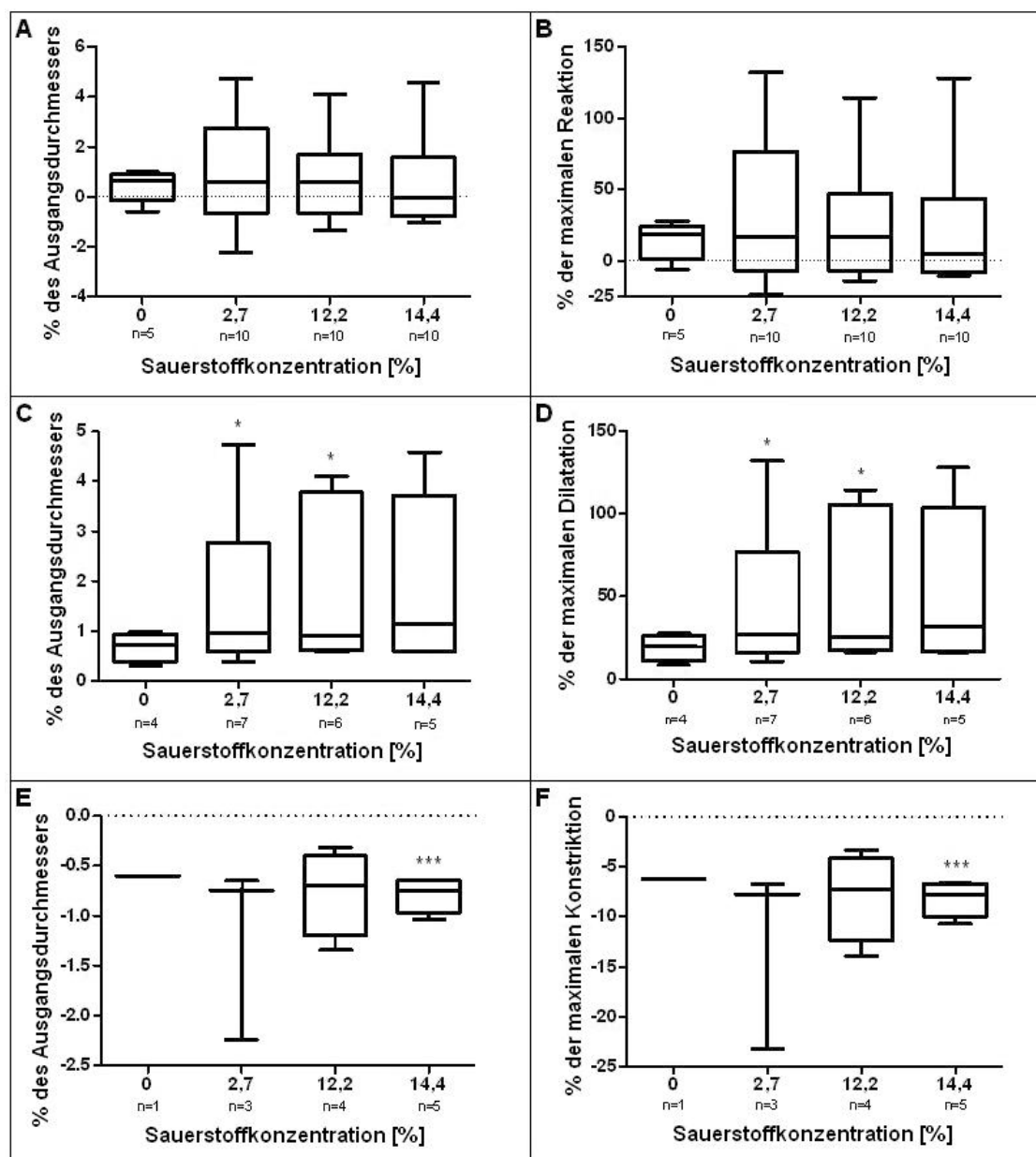


Abbildung 15: Vasomotorik in der Kontrollgruppe (n=10) in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration

Auf der linken Seite der Abbildung sind die gemessenen Werte als prozentuale Veränderung des Ausgangsdurchmessers bei Normoxie dargestellt. Auf der rechten Seite ist diese prozentuale Veränderung in Relation zu der in Vorversuchen ermittelten maximalen Reaktion (maximale Dilatation durch 0,1 mM Nitroprussid-Natrium bzw. maximale Konstriktion durch 1 mM Phenylephrin, siehe Kapitel 3.3.2.1) gezeigt.

A und **B** zeigt die Vasomotorik der Gesamtgruppe, **C** und **D** zeigen aus der Gesamtgruppe nur die Messwerte der dilatierenden Arteriensegmente und **E** und **F** zeigen aus der Gesamtgruppe nur die Messwerte der konstringierenden Arteriensegmente.

Negatives Vorzeichen auf der Y-Achse: Konstriktion des Arteriensegmentes; * p<0,05; *** p<0,001 (Student t-Test für gepaarte Stichproben bzw. Wilcoxon-Rangsummen-Test)

Tabelle 4: Messdaten der Kontrollgruppe

A) % des Ausgangsdurchmessers				
Sauerstoffkonzentration [%]	14,4	12,2	2,7	0
Gesamt	n=10	n=10	n=10	n=5
Median / Mittelwert	-0,03 / 0,58	0,60 / 0,77	0,60 / 0,92	0,66 / 0,43
Standardabweichung	1,86	1,81	2,03	0,63
Standardfehler	0,59	0,57	0,64	0,28
Kontraktion	n=5	n=4	n=3	n=1
Median / Mittelwert	-0,75 / -0,79	-0,70 / -0,77	-0,75 / -1,21	-0,60 / -0,60
Standardabweichung	0,17	0,43	0,89	---
Standardfehler	0,05	0,14	0,28	---
Dilatation	n=5	n=6	n=7	n=4
Median / Mittelwert	1,15 / 1,96	0,90 / 1,80	0,96 / 1,83	0,72 / 0,68
Standardabweichung	1,73	1,63	1,63	0,29
Standardfehler	0,55	0,52	0,52	0,13

B) % der maximalen Dilatation/Kontraktion				
Sauerstoffkonzentration [%]	14,4	12,2	2,7	0
Gesamt	n=10	n=10	n=10	n=5
Median / Mittelwert	4,81 / 23,20	16,84 / 26,92	16,84 / 31,94	18,37 / 14,00
Standardabweichung	46,24	45,37	48,45	13,28
Standardfehler	14,62	14,35	15,32	5,95
Kontraktion	n=5	n=4	n=3	n=1
Median / Mittelwert	-7,72 / -8,21	-7,22 / -7,91	-7,72 / -12,54	-6,21 / -6,21
Standardabweichung	1,76	4,43	9,24	---
Standardfehler	0,56	1,40	2,92	---
Dilatation	n=5	n=6	n=7	n=4
Median / Mittelwert	31,97 / 54,60	25,10 / 50,14	26,76 / 51,01	20,01 / 19,05
Standardabweichung	48,40	45,56	45,59	8,06
Standardfehler	15,31	14,41	14,42	3,61

Unter **A)** sind die gemessenen Werte als prozentuale Veränderung des Arterien­durchmessers der jeweiligen Arterien­segmente unter Hypoxie im Vergleich zum Ausgangsdurchmesser bei Normoxie angegeben. Unter **B)** sind diese Werte auf die in Vorversuchen ermittelte maximale Reaktion (Dilatation bzw. Konstriktion) bezogen.

Im Teil „**Gesamt**“ sind die Werte der Gesamtgruppe aufgeführt; die Anzahl n findet sich in jeder Spalte unter der dazugehörigen Sauerstoffkonzentration.

Anhand ihrer Reaktion auf Hypoxie ließen sich 2 Gruppen festlegen: Eine Gruppe von Arterien­segmenten dilatierte, die andere Gruppe konstringierte. Deshalb ist der folgende Tabellenteil als „**Konstriktion**“ und der jeweils untere Tabellenteil als „**Dilatation**“ betitelt. Die Anzahl n der Arterien­segmente, die konstringierten bzw. dilatierten, steht in der Zeile „**Konstriktion**“ bzw. „**Dilatation**“ und ist der entsprechenden Sauerstoffkonzentration zugeordnet.

Beispiel: Von 10 Arterien­segmenten, die einer Sauerstoffkonzentration von 14,4% ausgesetzt waren, konstringierten 5 Segmente im Mittel um 0,79% des Ausgangsdurchmessers (Tabellenteil A, Abschnitt Konstriktion, Zeile Median / Mittelwert). Die anderen 5 Arterien­segmente dilatierten durchschnittlich um 1,96% des Ausgangsdurchmessers (Tabellenteil A, Abschnitt Dilatation, Zeile Median / Mittelwert).

negatives Vorzeichen: Konstriktion; „---“: kein Wert vorhanden

4.2) Einfluss des Calciums auf die Hypoxie-induzierte Vasomotorik

4.2.1) Vasomotorik in calciumfreier Tyrode-Lösung

Im Vergleich zur Kontrollgruppe dilatierten in calciumfreier Tyrode-Lösung anteilig mehr Arteriensegmente mit sinkender Sauerstoffkonzentration (siehe Abbildung 16).

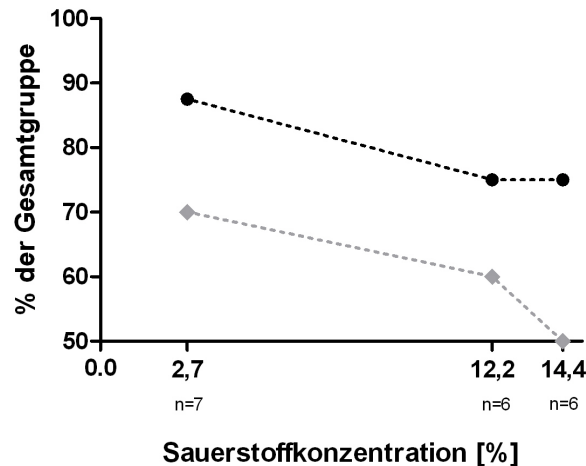


Abbildung 16: Prozentualer Anteil der dilatierenden Arteriensegmente, von der Gesamtzahl ($n=8$) der untersuchten Arteriensegmente in calciumfreier Lösung (Y-Achse) in Abhängigkeit von der prozentualen Sauerstoffkonzentration (X-Achse). Die Verbindung durch die gestrichelte Linie soll die Abhängigkeit der Dilatationshäufigkeit von der hypoxischen Sauerstoffkonzentration verdeutlichen. Die schwarze Linie und die n -Zahlen beziehen sich auf die Versuchsgruppe in calciumfreier Lösung, die graue Linie zeigt die Werte der Kontrollgruppe zum Vergleich.

Die Senkung der Sauerstoffkonzentration im Organbad und der Perfusionslösung auf 14,4% bewirkte bei 75% der Arteriensegmente in calciumfreier Lösung eine signifikante Dilatation um durchschnittlich $0,85\% \pm 0,19$ des Ausgangsdurchmessers bei Normoxie. Das sind 43,5% des Dilatationsausmaßes, das die Arteriensegmente der Kontrollgruppe (Wildtyp-Mäuse, calciumhaltige Tyrode-Lösung) bei gleichen Versuchsbedingungen erreichten ($1,96\% \pm 0,55$; $n=5/10$).

Im Gegensatz zur Kontrollgruppe nahm die Stärke der Dilatation mit fallender Sauerstoffkonzentration zu. Sie erreichte bei 2,7% Sauerstoffgehalt eine Dilatation um $1,53\% \pm 0,42$ des Ausgangsdurchmessers ($n=7/8$), das entspricht 83,7% der Dilatationsintensität der Arteriensegmente in der Kontrollgruppe bei dieser Sauerstoffkonzentration ($1,83\% \pm 0,52$; $n=7/10$). Die Dilatation in calciumfreier Tyrode-Lösung war bei allen Hypoxie-Stufen signifikant unterschiedlich zum Ausgangsdurchmesser (siehe Abbildung 17 und Tabelle 5).

In der Gruppe der Arteriensegmente, die mit Konstriktion reagierten, nahm die

Ergebnisse

Intensität der Konstriktion mit sinkender Sauerstoffkonzentration ab. Bei einer Sauerstoffkonzentration von 14,4% konstringierten die Arteriensegmente um durchschnittlich $1,14\% \pm 0,4$ des Ausgangsdurchmessers ($n=2/8$). Diese Konstriktion war fast doppelt so stark wie die der Arteriensegmente aus der Kontrollgruppe ($0,79\% \pm 0,05$; $n=5/10$).

Die Senkung der Sauerstoffkonzentration auf 12,2% bewirkte, dass nur noch eines von acht Arteriensegmenten um 0,39% des Ausgangsdurchmessers konstringierte. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ($0,77\% \pm 0,14$; $n= 4/10$) war die Konstriktion in calciumfreier Lösung geringer.

Bei einer Sauerstoffkonzentration von 2,7 % reagierte keines der Arteriensegmente der Gruppe, in der calciumfreie Tyrode-Lösung verwendet wurde, mit Konstriktion.

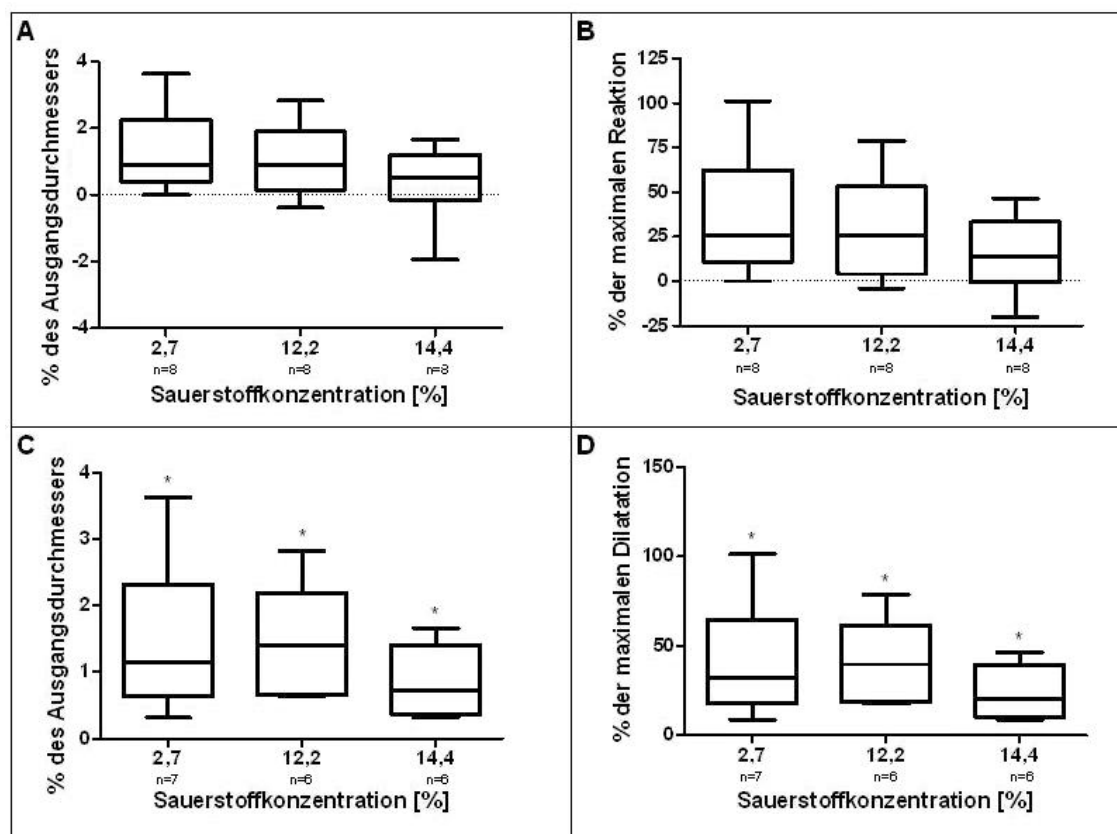


Abbildung 17: Vasomotorik in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration in calciumfreier Lösung (n=8)

Auf der linken Seite der Abbildung sind die gemessenen Werte als prozentuale Veränderung des Ausgangsdurchmessers bei Normoxie dargestellt. Auf der rechten Seite ist diese prozentuale Veränderung in Relation zu der in Vorversuchen ermittelten maximalen Reaktion (maximale Dilatation durch 0,1 mM Nitroprussid-Natrium bzw. maximale Konstriktion durch 1 mM Phenylephrin, siehe Kapitel 3.3.2.1) gezeigt.

In **A** und **B** sind die gemessenen Werte aller Arteriensegmente in calciumfreier Tyrode-Lösung aufgetragen. **A** zeigt die Messwerte der gesamten Gruppe als prozentualen Anteil des Ausgangsdurchmessers und **B** zeigt die Messwerte als prozentualen Anteil der maximalen Reaktion (Konstriktion bzw. Dilatation). Je niedriger die Sauerstoffkonzentration in der calciumfreien Tyrode-Lösung war, desto höher war sowohl die Anzahl der dilatierenden Arteriensegmente als auch die Intensität der Dilatation.

C und **D** zeigen aus der Gesamtgruppe nur die Gruppe der Arteriensegmente, die dilatierten. In **C** sind die Messwerte der dilatierenden Arteriensegmente in Relation zum Ausgangsdurchmesser dargestellt, in **D** sind diese auf die maximale Dilatation bezogen.

Für die Gesamtgruppe ergab sich kein signifikanter Unterschied der Vasomotorik bei hypoxischer Sauerstoffkonzentration zum Ausgangsdurchmesser bei Normoxie. In der Gruppe der Arteriensegmente, die mit Dilatation reagierten, war jedoch bei allen Hypoxie-Stufen ein signifikanter Unterschied festzustellen.

Negatives Vorzeichen auf der Y-Achse: Konstriktion des Arteriensegmentes; * $p < 0,05$ (Student t-Test für gepaarte Stichproben)

Tabelle 5: Messdaten der Vasomotorik in calciumfreier Tyrode-Lösung

A) Prozent des Ausgangsdurchmessers			
Sauerstoffkonzentration [%]	14,4	12,2	2,7
Gesamt	n=8	n=8	n=8
Median / Mittelwert	0,51 / 0,36	0,89 / 1,07	0,89 / 1,53
Standardabweichung	1,11	1,06	1,22
Standardfehler	0,39	0,38	0,43
Kontraktion	n=2	n=1	n=0
Median / Mittelwert	-1,14 / -1,14	-0,39 / -0,39	---
Standardabweichung	1,13	---	---
Standardfehler	0,40	---	---
Dilatation	n=6	n=6	n=7
Median / Mittelwert	0,72 / 0,85	1,41 / 1,49	1,15 / 1,53
Standardabweichung	0,54	0,85	1,18
Standardfehler	0,19	0,30	0,42

B) Prozent der maximalen Dilatation bzw. Kontraktion			
Sauerstoffkonzentration [%]	14,4	12,2	2,7
Gesamt	n=8	n=8	n=8
Median / Mittelwert	14,13 / 14,93	24,83 / 38,58	24,83 / 37,36
Standardabweichung	21,24	28,38	34,12
Standardfehler	7,50	10,03	12,06
Kontraktion	n=2	n=1	n=0
Median / Mittelwert	-11,80 / -11,80	-4,01 / -4,01	---
Standardabweichung	11,72	---	---
Standardfehler	4,14	---	---
Dilatation	n=6	n=6	n=7
Median / Mittelwert	20,04 / 23,82	39,23 / 41,51	32,09 / 42,70
Standardabweichung	14,97	23,62	33,06
Standardfehler	5,29	8,35	11,68

Unter **A)** sind die gemessenen Werte als prozentuale Veränderung des Arterien­durchmessers der jeweiligen Arterien­segmente unter Hypoxie im Vergleich zum Ausgangsdurchmesser bei Normoxie angegeben. Unter **B)** sind diese Werte auf die in Vorversuchen ermittelte maximale Reaktion (Dilatation bzw. Konstriktion) bezogen.

Im Teil „**Gesamt**“ sind die Werte der Gesamtgruppe aufgeführt. Anhand ihrer Reaktion auf Hypoxie ließen sich 2 Gruppen festlegen: Eine Gruppe von Arterien­segmenten dilatierte (Tabellenteil „**Dilatation**“), die andere Gruppe konstringierte (Tabellenteil „**Konstriktion**“). Die Anzahl n findet sich in jeder Spalte unter der dazugehörigen Sauerstoffkonzentration.

Bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen kam es vor, dass ein Arterien­segment wieder den Ausgangsdurchmesser erreichte und deswegen weder bei den Werten für Konstriktion, noch bei Dilatation aufgeführt ist.

Negatives Vorzeichen: Konstriktion; „---“: kein Wert vorhanden; Mittelwert: arithmetischer Mittelwert

4.2.2) Vasomotorik bei Blockade des Calciumeinstromes von extrazellulär durch NiCl_2

Alle Arteriensegmente in nickelchloridhaltiger Tyrode-Lösung reagierten mit einer signifikanten Konstriktion bei allen Hypoxie-Stufen (siehe Abbildung 18 und Tabelle 6). Bei einer Sauerstoffkonzentration von 14,4% betrug die durchschnittliche Konstriktion $1,31\% \pm 0,49$ des Ausgangsdurchmessers bei Normoxie. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war hier die Intensität der Konstriktion mehr als doppelt so stark ($0,79\% \pm 0,05$; $n=5/10$).

Mit sinkendem Sauerstoffgehalt in der Perfusionslösung und im Organbad stieg die Intensität der Konstriktion an und erreichte bei 2,7% Sauerstoff im Mittel $1,54\% \pm 0,44$ des Ausgangsdurchmessers. Die Konstriktion war somit nur noch leicht stärker als in der Kontrollgruppe ($1,21\% \pm 0,28$; $n=3/10$).

Die Vasomotorik in nickelchloridhaltiger Tyrode-Lösung war bei allen Sauerstoffkonzentrationen signifikant unterschiedlich zu den Werten der Kontrollgruppe (Wildtyp-Mäuse und calciumhaltige Tyrode-Lösung) und der Gruppe, bei der Wildtyp-Mäuse und calciumfreie Tyrode-Lösung verwendet wurde.

Tabelle 6: Messdaten der Versuchsreihe mit nickelchloridhaltiger Lösung

A) Prozent des Ausgangsdurchmessers			
Sauerstoffkonzentration [%]	14,4	12,2	2,7
Gesamt	n=6	n=6	n=6
Median / Mittelwert	-0,98 / -1,31	-1,91 / -1,42	-1,91 / -1,54
Standardabweichung	1,19	1,17	1,07
Standardfehler	0,49	0,48	0,44

B) Prozent der maximalen Kontraktion			
Sauerstoffkonzentration [%]	14,4	12,2	2,7
Gesamt	n=6	n=6	n=6
Median / Mittelwert	-10,12 / -13,6	-12,33 / -14,7	-12,33 / -15,93
Standardabweichung	12,32	12,09	11,08
Standardfehler	5,03	4,93	4,52

Unter **A)** sind die gemessenen Werte als prozentuale Veränderung des Arterien­durchmessers der jeweiligen Arterien­segmente unter Hypoxie im Vergleich zum Ausgangsdurchmesser bei Normoxie angegeben. Unter **B)** sind diese Werte auf die in Vorversuchen ermittelte maximale Konstriktion bezogen.

Mit sinkender Sauerstoffkonzentration und in Anwesenheit von 2,5 mM NiCl_2 nahm die Intensität der Konstriktion zu. Sowohl die Standardabweichung wie auch der Standardfehler wurden mit sinkender Sauerstoffkonzentration geringer.

Negatives Vorzeichen auf der Y-Achse: Konstriktion; Mittelwert: arithmetischer Mittelwert

Ergebnisse

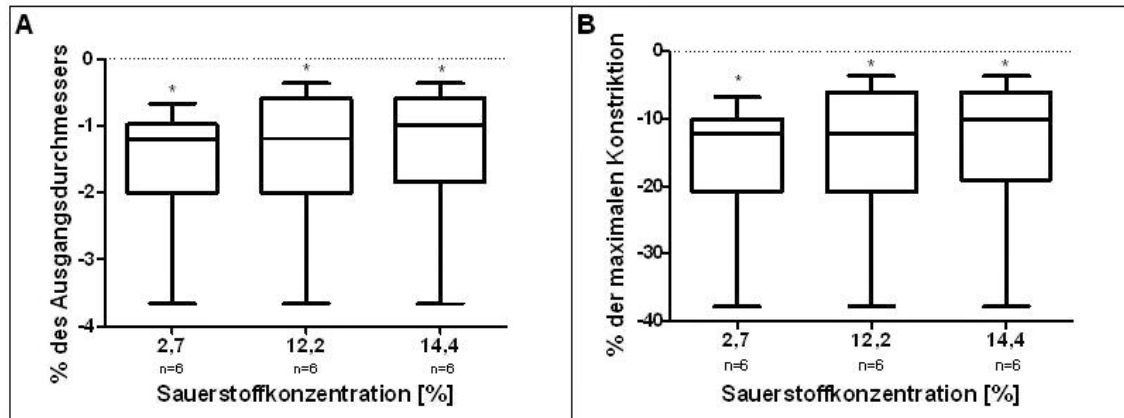


Abbildung 18: Vasomotorik in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration in nickelchloridhaltiger Tyrode-Lösung (n=6)

Auf der linken Seite der Abbildung sind die gemessenen Werte als prozentuale Veränderung des Ausgangsdurchmessers bei Normoxie dargestellt. Auf der rechten Seite ist diese prozentuale Veränderung in Relation zu der in Vorversuchen ermittelten maximalen Konstriktion durch 1 mM Phenylephrin gezeigt.

Die Konstriktionsstärke nahm bei Blockade des Calciumeinstromes von extrazellulär mit sinkender Sauerstoffkonzentration zu und war bei allen Hypoxie-Stufen signifikant unterschiedlich zum Ausgangsdurchmesser.

Negatives Vorzeichen auf der Y-Achse: Konstriktion des Arteriensegmentes; * $p < 0,05$ (Student t-Test für gepaarte Stichproben bzw. Wilcoxon-Rangsummen-Test)

4.3) Einfluss der eNOS auf die Hypoxie-induzierte Vasomotorik

Um den Stellenwert des endothelial gebildeten NO bei der Hypoxie-induzierten Vasomotorik zu untersuchen, wurde zunächst versucht, das Endothel der Mesenterialarterien mechanisch zu entfernen. Dies war jedoch bei Mesenterialarterien von Mäusen nicht möglich, ohne die Arterienwand zu beschädigen. Deshalb wurden für diese Untersuchung das Vorhandensein von endothelial generiertem NO mit Hilfe von eNOS^{-/-} Mäusen ausgeschlossen.

Bei den eNOS^{-/-} Mäusen stieg der prozentuale Anteil der dilatierenden Arteriensegmente mit sinkender Sauerstoffkonzentration (siehe Abbildung 19). Im Vergleich mit den Wildtyp-Mäusen der Kontrollgruppe war der Anteil der dilatierenden Arteriensegmente geringer.

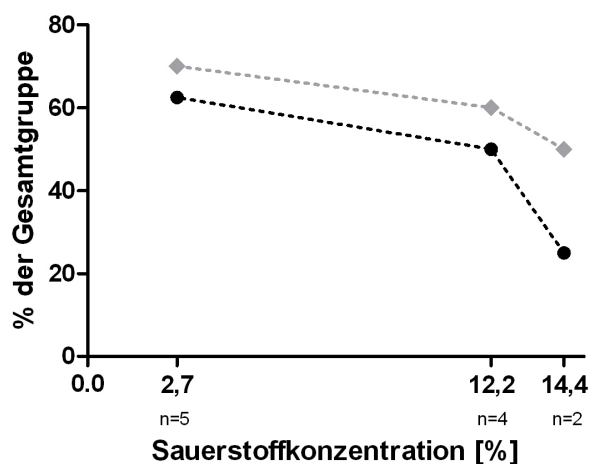


Abbildung 19: Prozentualer Anteil der dilatierenden Arteriensegmente von der Gesamtzahl (n=8) der untersuchten Arteriensegmente von eNOS^{-/-} Mäusen in calciumhaltiger Tyrode-Lösung (Y-Achse) in Abhängigkeit von der prozentualen Sauerstoffkonzentration (X-Achse). Die Verbindung durch die gestrichelte Linie soll die Abhängigkeit der Dilatationshäufigkeit von der hypoxischen Sauerstoffkonzentration verdeutlichen. Die schwarze Linie und die n-Zahlen beziehen sich auf die Versuchsgruppe der eNOS^{-/-} Mäuse, die graue Linie zeigt die Werte der Kontrollgruppe zum Vergleich.

Die Dilatation der Arteriensegmente von eNOS^{-/-} Mäusen betrug bei 14,4% Sauerstoff durchschnittlich $0,4\% \pm 0,1$ des Ausgangswertes bei Normoxie (n=2/8; p=0,2437) und lag damit weit unter dem Vergleichswert der Kontrollgruppe bei dieser Sauerstoffkonzentration ($1,96\% \pm 0,55$; n=5/10).

Die weitere Reduktion der Sauerstoffkonzentration auf 2,7% erhöhte die Intensität der Dilatation auf durchschnittlich $1,05\% \pm 0,17$ des Ausgangsdurchmessers (n=5/8). Die Dilatation erreichte jedoch nicht die Intensität der Dilatation, die bei Arteriensegmenten der Kontrollgruppe bei gleicher Hypoxie gemessen wurde ($1,83\% \pm 0,52$; n=7/10).

Bei 12,2% und 2,7% Sauerstoffgehalt war die Dilatation in der eNOS^{-/-} Gruppe zwar geringer als die der Kontrollgruppe, jedoch signifikant (siehe Abbildung 20).

Bei milder Hypoxie (14,4% Sauerstoffgehalt) konstringierten 3 von 8 Arteriensegmenten um durchschnittlich $1,37\% \pm 0,22$ des Ausgangsdurchmessers bei Normoxie. Die Konstriktion der Arteriensegmente von eNOS^{-/-} Mäusen war stärker als die der Wildtyp-Mäuse aus der Kontrollgruppe ($0,79\% \pm 0,05$, $n=5/10$).

Die Intensität der Konstriktion nahm mit sinkender Sauerstoffkonzentration zu und erreichte bei einer Sauerstoffkonzentration von 2,7% durchschnittlich $2,32\% \pm 0,46$ des Ausgangsdurchmessers ($n=3/8$; siehe Abbildung 20 und Tabelle 7). Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Intensität der Konstriktion bei den eNOS^{-/-} Mäusen bei allen Sauerstoffkonzentrationen in etwa doppelt so stark.

Die Anzahl der Arteriensegmente, die mit Konstriktion reagierten, blieb in der eNOS^{-/-} Gruppe unabhängig vom Grad der Hypoxie gleich ($n=3/8$), in der Kontrollgruppe nahm die Anzahl der konstringierenden Arteriensegmente mit zunehmender Hypoxie ab.

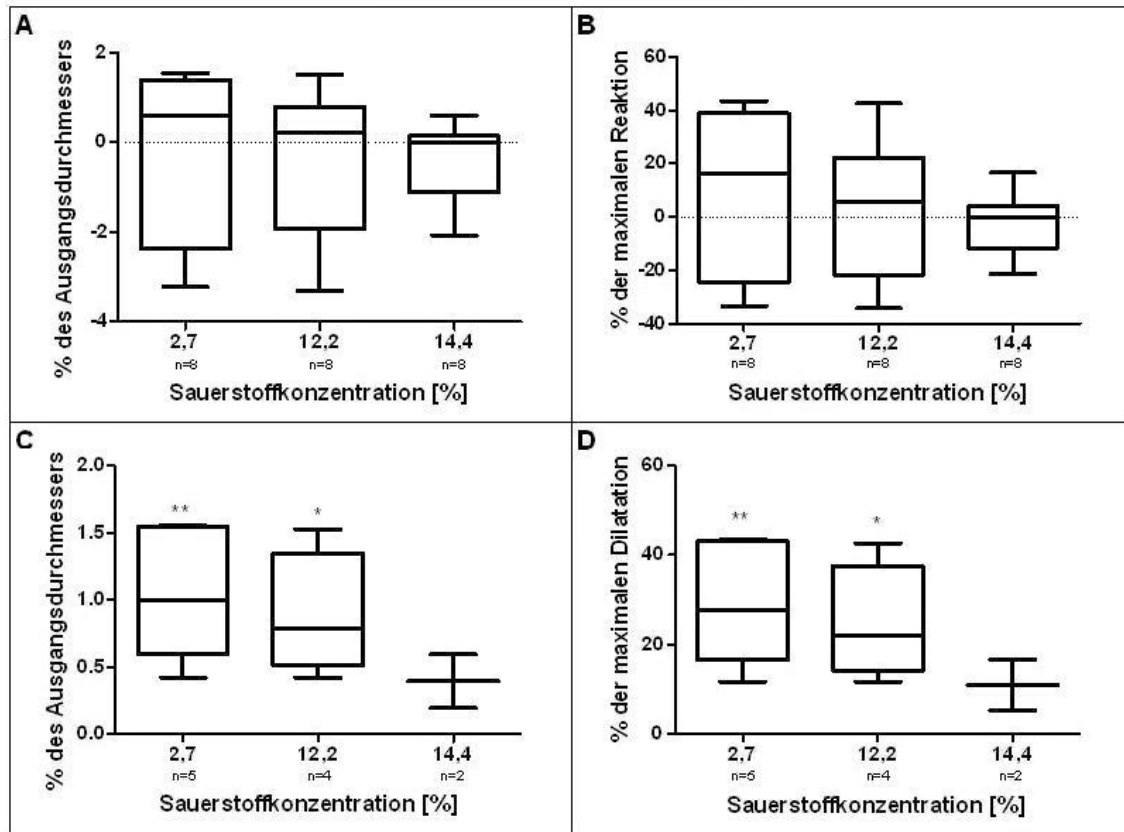


Abbildung 20: Vasomotorik der $eNOS^{-/-}$ Mäuse ($n=8$) in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration

Auf der linken Seite der Abbildung sind die gemessenen Werte als prozentuale Veränderung des Ausgangsdurchmessers bei Normoxie dargestellt. Auf der rechten Seite ist diese prozentuale Veränderung in Relation zu der in Vorversuchen ermittelten maximalen Reaktion (maximale Dilatation durch 0,1 mM Nitroprussid-Natrium bzw. maximale Konstriktion durch 1 mM Phenylephrin, siehe Kapitel 3.3.2.1) gezeigt

Abbildung **A** und **B** zeigen die gemessenen Werte aller Arteriensegmente der $eNOS^{-/-}$ Mäuse. **C** und **D** zeigen aus der Gesamtgruppe nur die Messwerte der dilatierenden Arteriensegmente. Für die Gesamtgruppe ergab sich kein signifikanter Unterschied der Vasomotorik bei Hypoxie zum Ausgangsdurchmesser bei Normoxie. In der Gruppe der Arteriensegmente, die mit Dilatation reagierten, war jedoch bei Sauerstoffkonzentrationen von 12,2% und 2,7% ein signifikanter Unterschied messbar.

Negatives Vorzeichen auf der Y-Achse: Konstriktion des Arteriensegmentes; * $p<0,05$; ** $p<0,01$ (Student t-Test für gepaarte Stichproben)

Tabelle 7: Messdaten der Versuchsreihe mit eNOS^{-/-} Mäusen

A) Prozent des Ausgangsdurchmessers			
Sauerstoffkonzentration [%]	14,4	12,2	2,7
Gesamt	n=8	n=8	n=8
Median / Mittelwert	0,00 / -0,42	0,21 / -0,33	0,59 / -0,211
Standardabweichung	0,88	1,68	1,91
Standardfehler	0,31	0,60	0,68
Kontraktion	n=3	n=3	n=3
Median / Mittelwert	-1,21 / -1,37	-2,42 / -2,05	-2,89 / -2,32
Standardabweichung	0,63	1,48	1,29
Standardfehler	0,22	0,52	0,46
Dilatation	n=2	n=4	n=5
Median / Mittelwert	0,40 / 0,40	0,79 / 0,88	0,99 / 1,05
Standardabweichung	0,28	0,46	0,49
Standardfehler	0,10	0,16	0,17

B) Prozent der maximalen Dilatation bzw. Kontraktion			
Sauerstoffkonzentration [%]	14,4	12,2	2,7
Gesamt	n=8	n=8	n=8
Median / Mittelwert	0,00 / -2,56	5,89 / 3,43	16,55 / 9,38
Standardabweichung	11,61	26,08	30,37
Standardfehler	4,10	9,21	10,73
Kontraktion	n=3	n=3	n=3
Median / Mittelwert	-12,51 / -10,64	-25,03 / -23,64	-29,92 / -24,00
Standardabweichung	6,52	11,32	13,38
Standardfehler	2,30	4,00	4,73
Dilatation	n=2	n=4	n=5
Median / Mittelwert	11,05 / 11,05	21,99 / 24,59	27,75 / 29,4
Standardabweichung	7,93	12,95	13,72
Standardfehler	2,80	4,58	4,85

Unter **A)** sind die gemessenen Werte als prozentuale Veränderung des Arterien­durchmessers der jeweiligen Arterien­segmente unter Hypoxie im Vergleich zum Ausgangsdurchmesser bei Normoxie angegeben. Unter **B)** sind diese Werte auf die in Vorversuchen ermittelte maximale Reaktion (Dilatation bzw. Konstriktion) bezogen.

Im Teil „**Gesamt**“ sind die Werte der Gesamtgruppe aufgeführt; die Anzahl n findet sich in jeder Spalte unter der dazugehörigen Sauerstoffkonzentration.

Anhand ihrer Reaktion auf Hypoxie ließen sich 2 Gruppen festlegen: Eine Gruppe von Arterien­segmenten dilatierte (Tabellenteil „**Dilatation**“), die andere Gruppe konstringierte (Tabellenteil „**Konstriktion**“). Die Anzahl n der Arterien­segmente, die konstringierten bzw. dilatierten, steht in der Zeile „**Konstriktion**“ bzw. „**Dilatation**“ und ist der entsprechenden Sauerstoffkonzentration zugeordnet.

Mit sinkender Sauerstoffkonzentration stieg der Anteil der dilatierenden Arterien­segmente. Die Intensität der Vasomotorik in beide Richtungen nahm mit sinkender Sauerstoffkonzentration zu.

Arterien­segmente, die wieder den Ausgangsdurchmesser erreichten, sind weder bei der Anzahl „n“ unter Dilatation, noch unter Konstriktion aufgeführt.

Negatives Vorzeichen: Konstriktion; Mittelwert: arithmetischer Mittelwert

4.4) Einfluss des TASK1-Kaliumkanals auf die Hypoxie-induzierte Vasomotorik

Unter Verwendung von TASK1^{-/-} Mäusen wurde der Einfluss dieses Kaliumkanals auf die Hypoxie-induzierte Vasomotorik untersucht. Durch die Senkung der Sauerstoffkonzentration im Organbad und in der Perfusionslösung auf 14,4% konnte bei einem von vier Arteriensegmenten eine Konstriktion um 0,31% des Ausgangswertes gemessen werden (siehe Abbildung 21 und Tabelle 8). Verglichen mit den konstringierenden Arteriensegmenten der Kontrollgruppe (Wildtyp-Mäuse und calciumhaltige Tyrode-Lösung) war im TASK1^{-/-} Modell die Intensität der Konstriktion bei dieser Sauerstoffkonzentration nur etwa halb so stark (0,31% in der TASK1^{-/-} Gruppe versus 0,79% \pm 0,05 in der Kontrollgruppe).

Die Intensität der Konstriktion erreichte bei der Sauerstoffkonzentration von 2,7% (n=1/4) 2,5% des Ausgangsdurchmessers bei Normoxie und damit mehr als das Doppelte der Arteriensegmente der Kontrollgruppe (1,21% \pm 0,28; n=3/10).

Bei zwei von vier Versuchen mit einem Sauerstoffgehalt von 14,4% wurde eine Dilatation um durchschnittlich 1,07% \pm 0,24 des Ausgangsdurchmessers gemessen. Die Intensität der Dilatation war nur etwa halb so groß wie bei den Arteriensegmenten der Kontrollgruppe unter gleichen Versuchsbedingungen (1,96% \pm 0,55; n=5/10).

Durch Reduktion der Sauerstoffkonzentration auf 2,7% nahm die Intensität der Dilatation zu und betrug 1,55% \pm 0,65 des Ausgangsdurchmessers. Die Intensität der Dilatation bei TASK1^{-/-} Mäusen erreichte jedoch nicht die Werte der Kontrollgruppe (1,83% \pm 0,52; n=7/10).

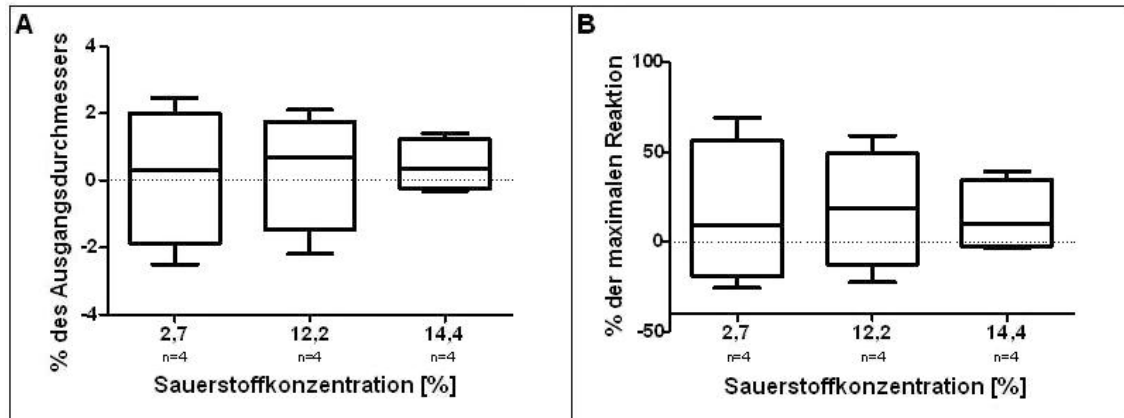


Abbildung 21: Vasomotorik bei $TASK1^{-/-}$ Mäusen in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration ($n=4$)

Dargestellt sind die Messwerte der gesamten Gruppe der Arteriensegmente von $TASK1^{-/-}$ Mäusen in calciumhaltiger Tyrode-Lösung.

Abbildung **A** zeigt die gemessenen Werte als prozentuale Veränderung des Ausgangsdurchmessers bei Normoxie. In Abbildung **B** ist diese prozentuale Veränderung in Relation zu der in Vorversuchen ermittelten maximalen Reaktion (maximale Dilatation durch 0,1 mM Nitroprussid-Natrium bzw. maximale Konstriktion durch 1 mM Phenylephrin siehe Kapitel 3.3.2.1) gezeigt.

Mit sinkender Sauerstoffkonzentration wurde die Streubreite der Messwerte größer. Aufgrund der geringen Zahl der Versuche lässt sich keine Signifikanz errechnen (Wilcoxon-Rangsummen-Test).

Negatives Vorzeichen auf der Y-Achse: Konstriktion

Ergebnisse

Tabelle 8: Messdaten der Versuchsreihe mit TASK1⁺ Mäusen

A) % des Ausgangsdurchmessers			
Sauerstoffkonzentration [%]	14,40	12,20	2,70
Gesamt	n=4	n=4	n=4
Median / Mittelwert	0,36 / 0,46	0,68 / 0,32	0,32 / 0,15
Standardabweichung	0,77	1,80	2,05
Standardfehler	0,38	0,90	1,03
Kontraktion	n=1	n=1	n=1
Median / Mittelwert	-0,31 / -0,31	-2,19 / -2,19	-2,15 / -2,5
Standardabweichung	---	---	---
Standardfehler	---	---	---
Dilatation	n=2	n=3	n=2
Median / Mittelwert	1,07 / 1,07	0,72 / 1,16	1,55 / 1,55
Standardabweichung	0,48	0,83	1,30
Standardfehler	0,24	0,42	0,65

B) % der maximalen Dilatation/Kontraktion			
Sauerstoffkonzentration [%]	14,40	12,20	2,70
Gesamt	n=4	n=4	n=4
Median / Mittelwert	10,12 / 14,08	18,95 / 18,56	8,84 / 15,16
Standardabweichung	19,77	33,34	39,99
Standardfehler	9,89	16,67	20,00
Kontraktion	n=1	n=1	n=1
Median / Mittelwert	-3,23 / -3,23	-22,60 / -22,60	-25,86 / -25,86
Standardabweichung	---	---	---
Standardfehler	---	---	---
Dilatation	n=2	n=3	n=2
Median / Mittelwert	29,78 / 29,78	20,23 / 32,30	43,24 / 43,24
Standardabweichung	13,50	23,15	36,16
Standardfehler	6,75	11,57	18,08

Unter **A)** sind die gemessenen Werte als prozentuale Veränderung des Arterien­durchmessers der jeweiligen Arterien­segmente unter Hypoxie im Vergleich zum Ausgangsdurchmesser bei Normoxie angegeben. Unter **B)** sind diese Werte auf die in Vorversuchen ermittelte maximale Reaktion (Dilatation bzw. Konstriktion) bezogen.

Im Teil „**Gesamt**“ sind die Werte der Gesamtgruppe aufgeführt. Anhand ihrer Reaktion auf Hypoxie ließen sich 2 Gruppen festlegen: Eine Gruppe von Arterien­segmenten dilatierte (Tabellenteil „**Dilatation**“), die andere Gruppe konstringierte (Tabellenteil „**Konstriktion**“). Die Anzahl n findet sich in jeder Spalte unter der dazugehörigen Sauerstoffkonzentration.

Bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen kam es vor, dass ein Arterien­segment wieder den Ausgangsdurchmesser erreichte und deswegen weder bei den Werten für Konstriktion, noch bei Dilatation aufgeführt ist.

Negatives Vorzeichen: Konstriktion; „---“: kein Wert vorhanden, Mittelwert: arithmetischer Mittelwert

4.5) Oszillationen des Arterien­durchmessers

Bei fast allen Versuchen schwankte (oszillierte) der Arterien­durchmesser. Die eingeschlossenen Versuche wurden, wie in Kapitel 3) Material und Methoden beschrieben, ausgewertet. Ziel dieser Auswertung war es, einen möglichen Einfluss der Sauerstoffkonzentration und der involvierten Signalmoleküle wie NO oder Calcium auf die Oszillationen zu identifizieren.

4.5.1) Amplitude der Durchmesserschwankungen

Die verschiedenen Versuchsreihen wiesen Oszillationen des Gefäß­durchmessers mit unterschiedlich starker Amplitude auf (siehe Abbildung 22).

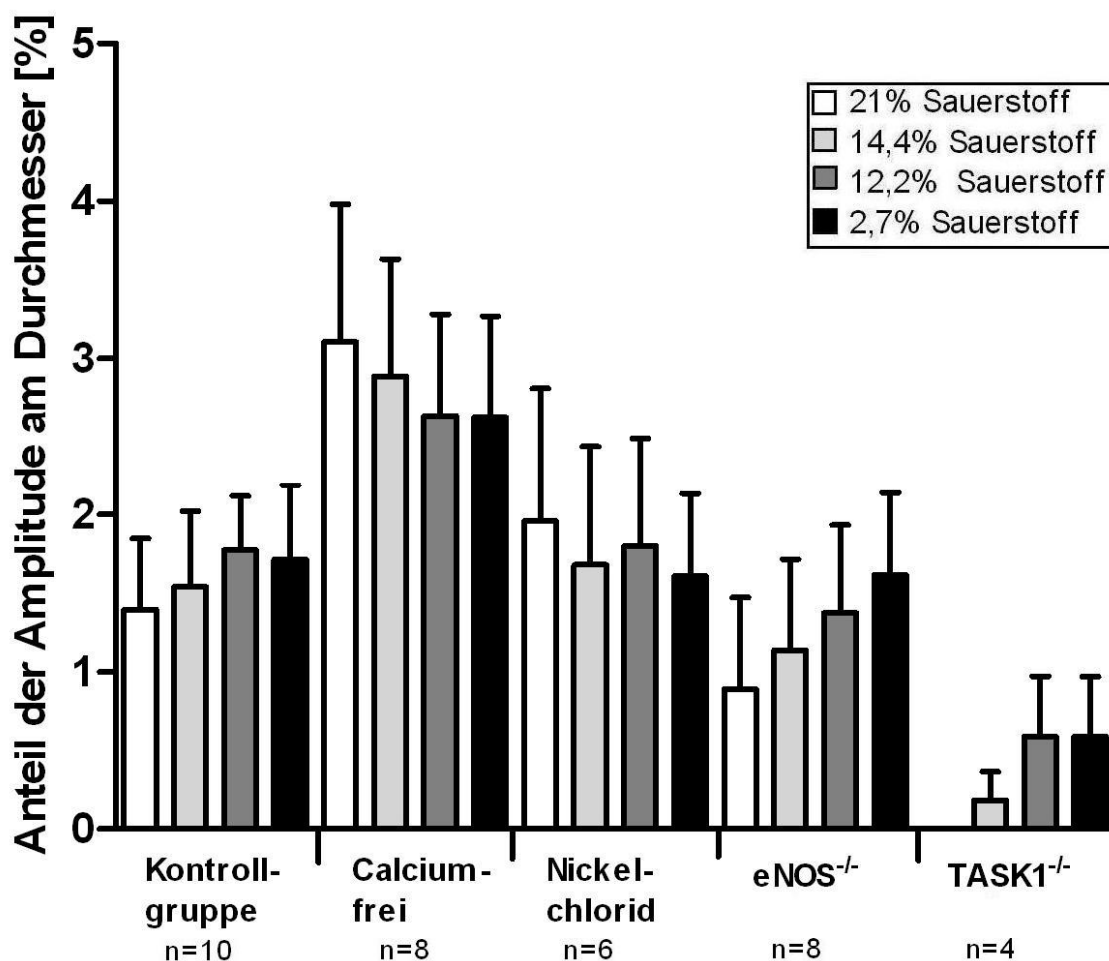


Abbildung 22: Abhängigkeit der Oszillationsamplitude der Durchmesserschwankung von der Sauerstoffkonzentration

Die durchschnittliche Amplitude der Durchmesserschwankung ist als prozentualer Anteil des jeweils aktuellen Durchmessers bei der aktuellen Sauerstoffkonzentration auf der Y-Achse aufgetragen.

Auf der X-Achse sind die einzelnen Versuchsreihen bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen nebeneinander gestellt.

Die größten prozentualen Anteile der Amplitude der Durchmesserschwankungen waren bei den Versuchen mit calciumfreier Tyrode-Lösung zu sehen (durchschnittlich $2,81\% \pm 0,72$ des Durchmessers), gefolgt von den Versuchen bei denen der Calciumeinstrom von extrazellulär durch NiCl_2 blockiert wurde (durchschnittlich $1,76\% \pm 0,64$ des Durchmessers). Die niedrigsten prozentualen Anteile der Durchmesserschwankungen am Gefäßdurchmesser zeigten sich bei den $\text{TASK1}^{-/-}$ Mäusen (durchschnittlich $0,34\% \pm 0,2$ des Durchmessers). Die statistische Analyse mit dem One-Way-ANOVA-Test ergab keinen signifikanten Unterschied der Mediane der Gruppen (Vergleich aller Gruppen gegeneinander und Vergleich der Kontrollgruppe gegen jede Gruppe einzeln).

4.5.2) Frequenz der Einzelausschläge

Neben der Oszillation des Gefäßdurchmessers traten vereinzelte schnelle Änderungen des Durchmessers in Richtung Dilatation und in Richtung Konstriktion auf (so genannte Ausschläge oder Spikes). Diese Ausschläge waren in den meisten Fällen (61,9%) in Richtung Dilatation gerichtet. In 9,5% der Fälle waren die Ausschläge in Richtung Konstriktion gerichtet und bei 28,6% der Versuche gab es nahezu keine auffälligen Ausschläge.

Die Frequenz dieser Ausschläge betrug bei allen Versuchsreihen im Mittel in Richtung Konstriktion 0,02 Hz und in Richtung Dilatation 0,032 Hz. Mit Abnahme der Sauerstoffkonzentration nahm die Frequenz der Ausschläge in beide Richtungen leicht zu.

4.5.3) Zeitlicher Anteil der Oszillationen an der Versuchszeit

Der prozentuale Anteil der zeitlichen Phasen, in denen Oszillationen registriert wurden (Oszillationsphasen), an der gesamten Versuchszeit nahm mit sinkender Sauerstoffkonzentration zu (siehe Abbildung 23).

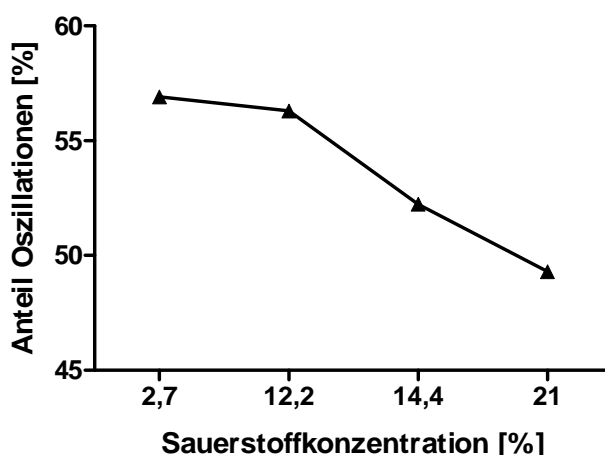


Abbildung 23: Prozentualer Anteil der zeitlichen Phasen, in denen Oszillationen auftraten, an der Versuchszeit (Y-Achse), abhängig von der prozentualen Sauerstoffkonzentration (X-Achse). Messwerte aller Versuchsreihen.

Der höchste prozentuale Anteil der Oszillationsphasen an der Versuchszeit war bei den Versuchen mit calciumfreier Tyrode-Lösung zu messen (80,3% der Versuchszeit; siehe Abbildung 24). Bei der Kontrollgruppe, den Versuchen mit NiCl_2 und bei den $\text{eNOS}^{-/-}$ Mäusen war der Anteil der Oszillationsphasen im Mittel etwa gleich (Kontrollgruppe: 58%; NiCl_2 : 59,7%; $\text{eNOS}^{-/-}$: 53,79% der Versuchszeit).

Die Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration war nicht bei allen Versuchsreihen gleich ausgeprägt. In der Kontrollgruppe stieg der Anteil der Oszillationsphasen mit sinkender Sauerstoffkonzentration. Nur bei intensiver Hypoxie von 2,7% Sauerstoff nahmen die Oszillationsphasen ab. Bei den Versuchen mit calciumfreier Lösung nahm der Anteil der Oszillationsphasen, wie auch die Amplitude der Oszillationen (siehe Abbildung 22) mit sinkender Sauerstoffkonzentration sogar ab. Bei den Versuchen mit NiCl_2 -haltiger Tyrode-Lösung und bei den $\text{eNOS}^{-/-}$ Mäusen war ein Trend zum Anstieg der Oszillationsphasen mit sinkender Sauerstoffkonzentration zu sehen.

Die statistische Analyse mit dem One-Way-ANOVA-Test ergab keinen signifikanten Unterschied der Mediane aller Gruppen (Vergleich aller Gruppen gegeneinander und Vergleich der Kontrollgruppe gegen jede Gruppe einzeln).

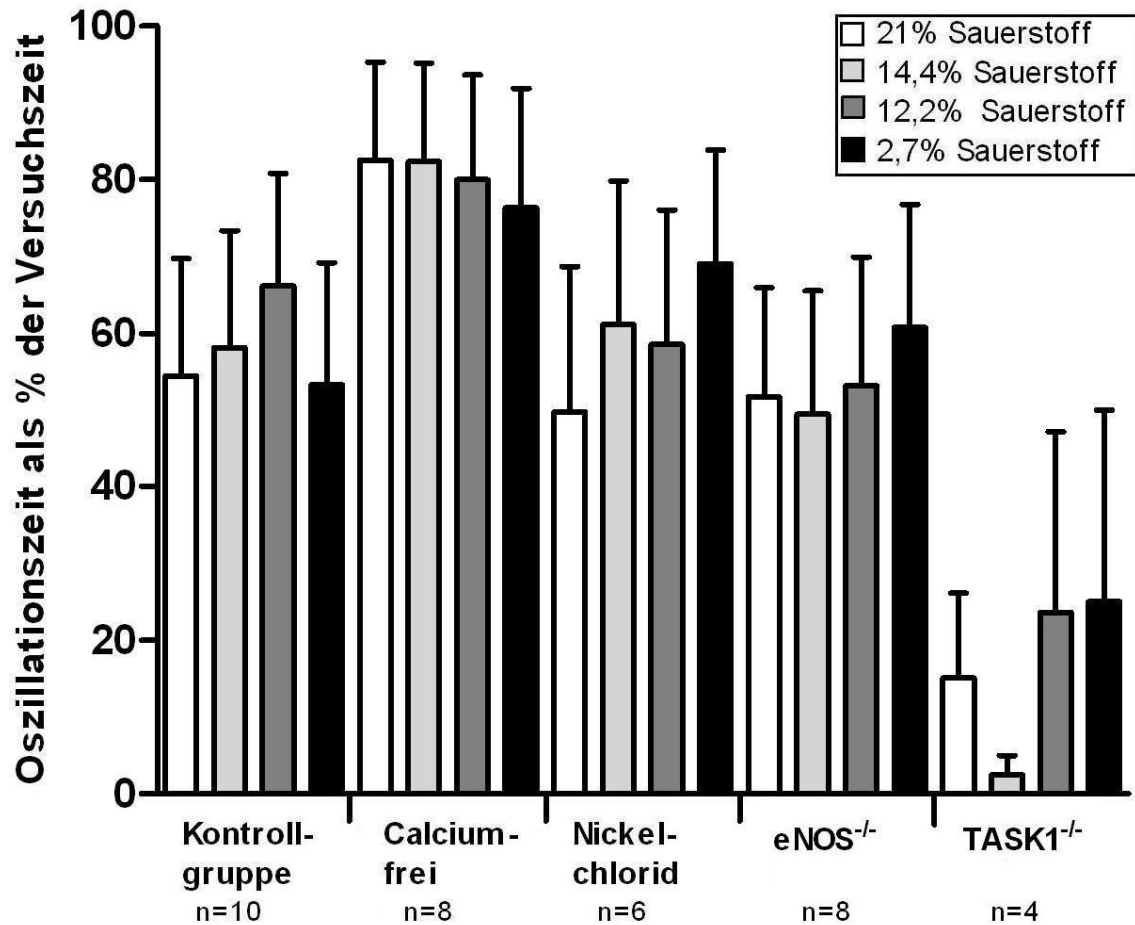


Abbildung 24: Oszillationszeit als prozentualer Anteil der Versuchszeit bei der jeweiligen Sauerstoffkonzentration (Y-Achse) für die einzelnen Versuchsreihen (X-Achse). Den größten Anteil der Oszillationszeit an der Versuchszeit hatten die Versuche in calciumfreier Lösung.

4.5.4) Einfluss der Phenylephrin-Konzentration auf die Oszillationszeit

In den 6 Messreihen mit steigenden Dosen Phenylephrin waren die Einzelausschläge immer in Richtung Dilatation gerichtet, die Amplitude war jedoch nicht immer gleich hoch. Die Frequenzen variierten um einen Median von 1,51/Minute (0,025 Hz).

Der Anteil der Versuchszeit, in dem der Gefäßdurchmesser oszillierte, betrug im Mittel $80\% \pm 0,77$ und nahm mit steigender PE-Konzentration leicht ab.

4.6) Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Unterschiede der Vasomotorik zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen wurden deutlicher sichtbar, je weiter die Sauerstoffkonzentration sank (siehe Tabelle 9). Die Mediane der Versuchsgruppen waren bei allen hypoxischen Sauerstoffkonzentrationen signifikant unterschiedlich voneinander (Kruskal-Wallis-Test).

Generell veränderte sich die Vasomotorik unter Hypoxie in zwei Richtungen: eine Gruppe der Arteriensegmente reagierte mit Dilatation, die andere mit Konstriktion. In der Kontrollgruppe war bei 14,4% Sauerstoff die Anzahl der Arteriensegmente, die dilatierten, genau so groß wie die der Arteriensegmente, die konstringierten. Der Median lag bei dieser Versuchsreihe fast exakt bei Null (siehe Abbildung 25A). Die Intensität der Dilatation - gemessen als prozentualer Anteil des Ausgangsdurchmessers - war stärker als die der Konstriktion.

Tabelle 9: Vergleich der Mittelwerte aller Versuchsgruppen als % des Ausgangsdurchmessers

GESAMT						
	Sauerstoffkonzentration [%]					
	14,4	12,2	2,7			
KG	0,58 ± 0,59	0,77 ± 0,57	0,92 ± 0,64			
Ca ²⁺ -frei	0,36 ± 0,39	1,07 ± 0,38	1,53 ± 0,42			
NiCl ₂	-1,31 ± 0,49	-1,42 ± 0,48	-1,54 ± 0,44			
eNOS ^{-/-}	-0,42 ± 0,31	-0,33 ± 0,6	-0,21 ± 0,68			
TASK1 ^{-/-}	0,46 ± 0,38	0,32 ± 0,9	0,15 ± 1,03			

	DILATATION			KONSTRIKTION		
	Sauerstoffkonzentration [%]			Sauerstoffkonzentration [%]		
	14,4	12,2	2,7	14,4	12,2	2,7
KG	1,96 ± 0,55	1,79 ± 0,52	1,83 ± 0,52	-0,79 ± 0,05	-0,77 ± 0,14	-1,21 ± 0,28
Ca ²⁺ -frei	0,85 ± 0,19	1,49 ± 0,30	1,53 ± 0,42	-1,14 ± 0,40	-0,39	---
NiCl ₂	---	---	---	-1,31 ± 0,49	-1,42 ± 0,48	-1,54 ± 0,44
eNOS ^{-/-}	0,40 ± 0,10	0,88 ± 0,16	1,05 ± 0,17	-1,37 ± 0,22	-2,04 ± 0,52	-2,32 ± 0,46
TASK1 ^{-/-}	1,07 ± 0,24	1,16 ± 0,41	1,55 ± 0,65	-0,31	-2,19	-2,5

Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aller Gruppen. bei der jeweiligen Sauerstoffkonzentration.

Im oberen Tabellenteil „GESAMT“, sind die Werte der jeweiligen Gesamtgruppe aufgeführt, im unteren Tabellenteil sind diese für die Gruppe der Arteriensegmente, die dilatierten und die der Arteriensegmente, die konstringierten, getrennt dargestellt.

KG: Kontrollgruppe; Ca²⁺-frei: Calciumfreie Tyrode-Lösung; NiCl₂: NiCl₂-haltige Tyrode-Lösung, eNOS^{-/-}: eNOS-Knockout-Mäuse; TASK1^{-/-}: TASK1-Knockout-Mäuse
Negatives Vorzeichen: Konstriktion; „---“: kein Wert vorhanden.

Bei moderater Hypoxie von 12,2% Sauerstoffgehalt verschob sich die Vasomotorik der Arteriensegmente der Kontrollgruppe weiter in Richtung Dilatation (siehe Abbildung 25B). Unter intensiver Hypoxie (2,7% Sauerstoff, siehe Abbildung 26 und Tabelle 9) nahm die Tendenz zur Dilatation nur noch leicht zu. Die Zahl der Arteriensegmente, die konstringierten, nahm mit sinkender Sauerstoffkonzentration ab. Die Intensität der Konstriktionen wurde jedoch stärker (siehe Tabelle 4, Kapitel 4.1).

Die Häufigkeit des Auftretens von Oszillationen des Gefäßdurchmessers und die Amplitude der Oszillationen stiegen in der Kontrollgruppe mit zunehmender Hypoxie an. Bei starker Hypoxie von 2,7% Sauerstoffgehalt sanken beide Werte wieder leicht ab.

Der Großteil der Arteriensegmente, bei denen Wildtyp-Mäuse und calciumfreie Tyrode-Lösung verwendet wurden, reagierte mit Dilatation. Die Vasomotorik der Arteriensegmente in calciumfreier Lösung zeigte schon bei 14,4% Sauerstoff überwiegend die Tendenz in Richtung Dilatation. Dieser Trend wurde bei 12,2% Sauerstoff noch deutlicher (siehe Abbildung 25 und Tabelle 9). Bei intensiver Hypoxie reagierten die Arteriensegmente in calciumfreier Lösung fast ausschließlich mit Dilatation (siehe Abbildung 26).

In der Gruppe, bei der calciumfreie Tyrode-Lösung verwendet wurde, traten die höchsten Amplituden der Durchmesser-Oszillationen auf und der Anteil der Versuchszeit, in dem das Arteriensegment oszillierte, war auch am höchsten von allen Versuchsgruppen.

Die Gruppe der Arteriensegmente, bei denen NiCl_2 zur Perfusionslösung und zum Organbad gegeben wurde, reagierte ausschließlich mit einer Hypoxie-induzierten Konstriktion. Bei leichter Absenkung des Sauerstoffgehaltes von 14,4% auf 12,2% wurde die Intensität der Konstriktion stärker und intensivte sich noch weiter bei einer Hypoxie von 2,7% Sauerstoffgehalt (siehe Abbildung 26 und Tabelle 9). Die Mittelwerte der Vasomotorik (ohne Unterscheidung zwischen Dilatation und Konstriktion) der Gesamtgruppe, bei der NiCl_2 verwendet wurde, waren 1.) signifikant unterschiedlich zu denen aus der Kontrollgruppe (in der Wildtyp-Mäuse und calciumhaltige Tyrode-Lösung verwendet wurden) und 2.) signifikant unterschiedlich zu denen der Gruppe, bei der Wildtyp-Mäuse und calciumfreie Tyrode-Lösung verwendet wurden (Mann-Whitney-Test; siehe Abbildung 25 und 26). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen diesen Gruppen nahm mit sinkender Sauerstoffkonzentration zu.

Die Amplitude der Durchmesser-Oszillationen war in dieser Versuchsgruppe etwas höher als in der Kontrollgruppe, der Anteil der Oszillationszeit an der Versuchszeit unterschied sich kaum von der Kontrollgruppe.

Bei den $\text{eNOS}^{-/-}$ Mäusen lag der Median der Vasomotorik-Messwerte bei moderater

Hypoxie von 14,4% in etwa bei Null und verschob sich mit zunehmender Hypoxie in Richtung Dilatation. Die Anzahl der Arteriensegmente, die mit Konstriktion reagierten, blieb in dieser Versuchsgruppe gleich (n=3). Die Anzahl der dilatierenden Arteriensegmente stieg jedoch mit zunehmendem Hypoxiegrad. Auch die Intensität der Dilatationen wurde mit sinkendem Sauerstoffgehalt der Perfusionslösung und des Organbades stärker (siehe Tabelle 7, Kapitel 4.3).

Die Amplitude der Oszillationen war geringer als in der Kontrollgruppe und nahm mit sinkender Sauerstoffkonzentration zu.

Bei den TASK1^{-/-} Mäusen überwog bei moderater Hypoxie die Vasomotorik in Richtung Dilatation (siehe Abbildung 25A). Mit zunehmender Hypoxie nahm der Interquartilsabstand zu. Das liegt daran, dass ein Arteriensegment mit Konstriktion reagierte und diese Konstriktion mit sinkender Sauerstoffkonzentration an Intensität zunahm (siehe Tabelle 8, Kapitel 4.4).

Oszillationen traten bei TASK1^{-/-} Mäusen seltener auf als in den anderen Versuchsgruppen.

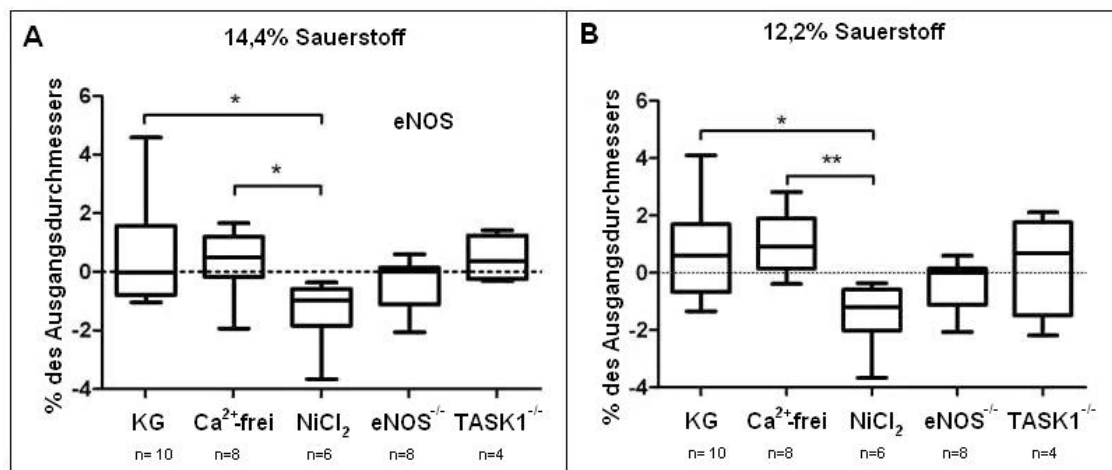


Abbildung 25: Vasomotorik aller Versuchsgruppen bei **A** 14,4% Sauerstoff und **B** 12,2% Sauerstoff

Die Messwerte sind als prozentuale Veränderung im Vergleich zum Ausgangsdurchmesser bei Normoxie (Y-Achse) dargestellt. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Versuchsreihen nebeneinander gestellt.

Die Mediane aller Versuchsgruppen sind signifikant unterschiedlich voneinander (Kruskal-Wallis-Test).

Bei jeder Sauerstoffkonzentration sind die Mittelwerte der Kontrollgruppe und der Gruppe, in der NiCl₂ verwendet wurde, signifikant unterschiedlich voneinander. Auch unterscheiden sich die Mittelwerte der NiCl₂-Gruppe signifikant von denen der Gruppe mit calciumfreier Lösung.

KG: Kontrollgruppe; Ca²⁺-frei: Calciumfreie Tyrode-Lösung; NiCl₂: NiCl₂-haltige Tyrode-Lösung, eNOS^{-/-}: eNOS-Knockout-Mäuse; TASK1^{-/-}: TASK1-Knockout-Mäuse

Negatives Vorzeichen auf der Y-Achse: Konstriktion des Arteriensegmentes; * p<0,05; ** p<0,01 (Mann-Whitney-Test)

Ergebnisse

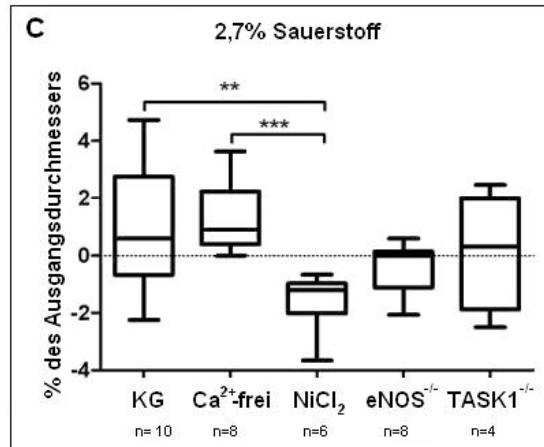


Abbildung 26: Vasomotorik aller Gruppen bei Hypoxie von 2,7% Sauerstoff in der Perfusionslösung und im Organbad

Wie auch bei moderater Hypoxie unterscheiden sich die Mediane aller Versuchsgruppen signifikant voneinander.

Die Mittelwerte der Gruppe, bei der NiCl₂ verwendet wurde, unterscheiden sich signifikant von denen der Kontrollgruppe und denen der Gruppe mit calciumfreier Tyrode-Lösung.

KG: Kontrollgruppe; Ca²⁺-frei: Calciumfreie Tyrode-Lösung; NiCl₂: NiCl₂-haltige Tyrode-Lösung, eNOS^{-/-}: eNOS-Knockout-Mäuse; TASK1^{-/-}: TASK1-Knockout-Mäuse

Negatives Vorzeichen auf der Y-Achse: Konstriktion des Arteriensegmentes; ** p<0,01; *** p<0,001 (Mann-Whitney-Test)

Der statistische Vergleich der Mittelwerte der Versuchsgruppen gegeneinander ergab, dass nur die Mittelwerte der Gruppe, in der NiCl₂ verwendet wurde, signifikant unterschiedlich zu denen der Kontrollgruppe und denen der Gruppe in calciumfreier Lösung waren (Mann-Whitney-Test, siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: p-Werte des statistischen Vergleichs der Mittelwerte der Versuchsreihen gegeneinander

14,4% Sauerstoff

	Kontrollgruppe	Calciumfrei	Nickelchlorid	eNOS ^{-/-}	TASK1 ^{-/-}
Kontrollgruppe		0,6965	* 0,0312	0,3154	0,5395
Calciumfrei	0,6965		* 0,0127		

12,2% Sauerstoff

	Kontrollgruppe	Calciumfrei	Nickelchlorid	eNOS ^{-/-}	TASK1 ^{-/-}
Kontrollgruppe		0,3599	* 0,0110	0,5726	1
Calciumfrei	0,3599		** 0,0013		

2,7% Sauerstoff

	Kontrollgruppe	Calciumfrei	Nickelchlorid	eNOS ^{-/-}	TASK1 ^{-/-}
Kontrollgruppe		0,5148	** 0,0075	0,5148	0,6354
Calciumfrei	0,5148		*** 0,0007		

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,01 (Mann-Whitney-Test)

5) Diskussion

5.1) Verwendung der Maus als Versuchsmodell

In diesem Versuchsmodell wurde mit Mäusen gearbeitet, um die Möglichkeit des Ausschaltens einzelner Gene bei Knockout-Mäusen nutzen zu können. Es wurden eNOS^{-/-} Mäuse verwendet, um den Einfluss des endothelial synthetisierten NO auf die Hypoxie-induzierte Vasomotorik zu untersuchen. Des Weiteren wurde mit Hilfe von TASK1^{-/-} Mäusen der Stellenwert dieses Tandemporen-Kaliumkanales bei der hypoxischen Vasomotorik überprüft.

Bei der Etablierung des Versuchsmodells der Maus traten folgende Schwierigkeiten auf:

- 1.) Der Innendurchmesser der Mesenterialarterien der Mäuse war geringer (im Mittel $149 \pm 3,97 \mu\text{m}$) als bei Ratten ($300\text{--}380 \mu\text{m}$ (51)). Deshalb war die Feinpräparation unter dem Mikroskop schwieriger und die Gefahr der Perforation höher.
- 2.) Aufgrund des geringen Durchmessers der Arterien konnte das Endothel nicht mechanisch entfernt werden. Bei Ratten ist zur mechanischen Entfernung des Endothels eine Methode etabliert, bei der das Arteriensegment zehn Mal über ein Pferdehaar gezogen wird (51). Diese Methode führte bei Mesenterialarterien von Mäusen zu einer Beeinträchtigung der unter dem Endothel befindlichen Muskelzellschicht und das Arteriensegment war nach dieser Prozedur avital.
- 3.) Die Ergebnisse von Versuchen mit Ratten sind nicht vollständig mit denen von Mäusen vergleichbar. Die Konzentration von Phenylephrin, bei der die maximale Konstriktion eintrat, lag bei Mäusen bei 1 mM, bei Ratten wurde die maximale Konstriktion bereits bei einer PE-Konzentration von 10 μM erreicht (52).

5.2) Oszillationen des Arterien­durchmessers

Der Begriff „Oszillationen“ hat je nach Kontext verschiedene Bedeutungen.

- 1.) Oszillationen einzelner VSMC werden durch intrazelluläre „Calcium-Wellen“, Schwankungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (siehe Abbildung 27), verursacht. Die Synchronisation der Oszillationen einzelner VSMC führt zur sogenannten Vasomotion. Das Phänomen der Vasomotion ist lange bekannt, aber noch nicht vollständig verstanden.
- 2.) Die Oszillationen, die ich gemessen und beschrieben habe, bezeichnen die rhythmischen Schwankungen des Gefäß­durchmessers. Diese sind Folge der durch Synchronisation der VSMC-Oszillationen hervorgerufenen Vasomotion.

Bei allen Versuchsreihen waren Oszillationen (Schwankungen) des Gefäßdurchmessers zu beobachten. Der Anteil an der Versuchszeit, in der Oszillationen auftraten, stieg mit zunehmender Hypoxie.

Bei der Auswertung der Oszillationen des Gefäßdurchmessers ergaben sich in meiner Studie folgende Schwierigkeiten: 1.) Es wurde ein analoger Schreiber benutzt, weshalb eine genaue Frequenzbestimmung der Oszillationen nicht möglich war. Die Frequenz der einzeln auftretenden Ausschläge (Spikes, siehe Kapitel 4.5.2) konnte aufgrund der Schreibgeschwindigkeit von 15 cm/h und der Trägheit des Schreibers bis zu einer Maximalfrequenz von circa 0,7 Hz ermittelt werden. 2.) Die Messung der Amplitude der Oszillationen war nur eingeschränkt anhand der Breite der Schreiberlinie möglich.

Dennoch lassen sich meine Erkenntnisse in die aktuell diskutierten Mechanismen der Vasomotion wie folgt einordnen:

In einem Review aus dem Jahr 2011 beschreiben Aalkjaer et al. die Variation der Oszillations-Frequenz von isolierten Arterien in einem Bereich von 0,01 bis 0,3 Hz, wobei die Oszillations-Frequenz umgekehrt proportional zum Arterienradius ist (1). Die Frequenzen, die ich anhand der Einzel-Ausschläge ermitteln konnte, lagen mit 0,02 Hz in Richtung Kontraktion und 0,032 Hz in Richtung Dilatation in diesem Bereich. Die Frequenz der Gefäß-Oszillation war höher und deshalb aus oben beschriebenen Gründen nicht sicher ermittelbar.

Die physiologische Rolle der Vasomotion ist noch nicht im Einzelnen geklärt. Es herrscht jedoch Konsens darüber, dass die Vasomotion nicht zum eigentlichen Blutfluss beiträgt, sondern die Gewebeoxygenierung und den Abtransport von metabolischen Abfallprodukten verbessert (1).

Der genaue Mechanismus der Vasomotion auf zellulärer Ebene ist zurzeit noch Gegenstand der Forschung und es gibt einige gegensätzliche Erkenntnisse. Zum Beispiel gibt es Arbeitsgruppen, die im mesenterialen Gefäßbett der Ratte eine Abhängigkeit der Synchronisation der Oszillationen, die zur Vasomotion führt, vom Vorhandensein intakten Endothels fanden (95). Einige andere Arbeitsgruppen fanden für andere Gefäßbetten und andere Spezies heraus, dass die Synchronisation der Oszillationen nach Entfernen des Endothels verstärkt auftrat (1).

Einige der bisherigen Erkenntnisse sind in Abbildung 27 zusammengefasst dargestellt.

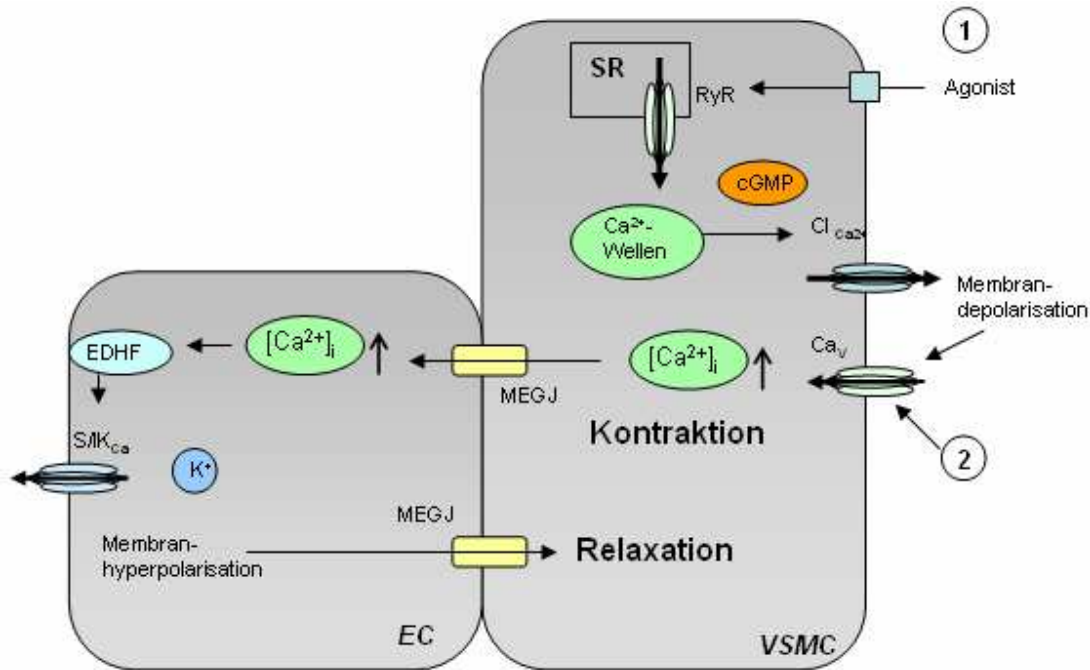


Abbildung 27: Zelluläre Mechanismen der Vasomotion in Mesenterialarterien der Ratte (modifiziert nach Rahman (95) und Aalkjaer (1))

In jeder VSMC gibt es rhythmische Ca^{2+} -Oszillationen (Ca^{2+} -Wellen), die nur zur Vasomotion führen, wenn sie synchronisiert werden.

Diese Ca^{2+} -Oszillationen können 1) durch Agonisten-induzierte Stimulation einer Calciumfreisetzung über den RyR aus dem SR verursacht werden, oder aber 2) durch einen Calciumeinstrom über Ca_V . Die Ca^{2+} -Oszillationen, die durch Calciumfreisetzung aus dem SR entstehen, führen über Aktivierung calciumabhängiger Chloridkanäle ($\text{Cl}_{\text{Ca}^{2+}}$) zu einer Depolarisation der VSMC-Membran. Die Aktivierung der $\text{Cl}_{\text{Ca}^{2+}}$ ist vom Vorhandensein von cGMP beeinflusst. Durch die Membrandepolarisation wird ein Calciumeinstrom durch Ca_V aktiviert, der zu einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der VSMC und einer Kontraktion der VSMC führt. Die erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kann zu einem Calciumionen-Fluss über MEGJ in die EC führen. In der EC wird durch die erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ unter anderem der EDHF-Signalweg aktiviert. Dieser führt zur Hyperpolarisation, die wiederum durch MEGJ die VSMC erreichen kann und diese relaxiert.

Die Abhängigkeit der Vasomotion von intaktem Endothel variiert zwischen Gefäßbetten und Spezies. Für Mesenterialarterien von Ratten ist bekannt, dass die Vasomotion, die unabhängig vom SR ist, von intaktem Endothel abhängt (56). Hierbei wird sowohl die Rolle von NO und cGMP, als auch von EDHF diskutiert (1). Das Endothel scheint für die Synchronisation der Oszillationen der einzelnen VSMC und für die Frequenz und Amplitude der Vasomotion verantwortlich zu sein (95). Hierbei spielen S/IK_{Ca} und MEGJ eine mögliche Rolle (56,95).

Für Mesenterialarterien von Mäusen fehlen bislang Studien, die eine Endothelabhängigkeit der Vasomotion untersuchen. Meine Daten von $\text{eNOS}^{-/-}$ Mäusen zeigen, dass endothelial generiertes NO in Mesenterialarterien von Mäusen einen Einfluss auf die Vasomotion hat. Oszillationen traten zu einem ähnlichen prozentualen

Anteil der Versuchszeit auf, jedoch war ihre Amplitude um 22,4% geringer als bei Wildtyp-Mäusen, was auf eine höhere Oszillationsfrequenz schließen lassen könnte. Dieses Ergebnis reiht sich insofern in die bisherigen Erkenntnisse ein, als dass die Calciumfreisetzung aus dem SR von cGMP inhibiert werden kann (96). Bei eNOS^{-/-} Mäusen wird durch das Fehlen von endothelialem NO weniger cGMP durch die sGC synthetisiert. Das führt zu einer geringeren Inhibition der Calciumfreisetzung aus dem SR und zu einer Erhöhung der Frequenz der SR-abhängigen Vasomotion.

Essentiell für die Vasomotion ist der Calciumeinstrom in die VSMC. Demnach wäre zu vermuten, dass die Vasomotion in calciumfreier Lösung und bei Blockade des Calciumeinstroms von extrazellulär durch NiCl₂ abnimmt.

Meine Daten der Versuche in calciumfreier Lösung zeigen ein häufigeres Vorkommen von Oszillationen, gemessen als prozentualer Anteil der Versuchszeit. Die Amplitude der Oszillationen war höher als die der Kontrollgruppe und der anderen Versuchsgruppen.

Bei Blockade des Calciumeinstroms von extrazellulär durch Ca_v mit Hilfe von NiCl₂ war das Vorkommen von Oszillationen ähnlich häufig wie in der Kontrollgruppe. Die Amplitude der Oszillationen war im Durchschnitt etwas höher als die der Kontrollgruppe. Auffällig ist, dass die Amplitude vor allem bei Normoxie unter Verwendung von NiCl₂ deutlich höher war als in der Kontrollgruppe.

Die Unabhängigkeit der Oszillationen von extrazellulärem Calcium in Mesenterialarterien von Mäusen lässt vermuten, dass in diesem Gefäßsystem bei der Spezies Maus die SR-abhängige Vasomotion überwiegt.

Bei TASK1^{-/-} Mäusen traten Oszillationen des Gefäßdurchmessers nur selten auf. Ihre Amplitude war geringer als bei allen anderen Versuchsgruppen. Das könnte auf eine mögliche Involvierung von Tandemporen-Kaliumkanälen bei der Vasomotion hinweisen. Zurzeit gibt es über die Involvierung der Tandemporen-Kaliumkanäle bei der Vasomotion noch keine Studien.

Der Einfluss der Hypoxie auf die Vasomotion ist noch weitgehend unbekannt. Da jedoch die physiologische Funktion dieses Phänomens darin vermutet wird, dass Vasomotion die Gewebeoxygenierung verbessert, ist es nahe liegend, dass Hypoxie sich positiv auf die Vasomotion auswirkt. Hypoxie führt zu einer Abnahme der intrazellulären ATP-Konzentration. Durch verminderte Funktion ATP-abhängiger Calcium-Pumpen kommt es zu einem Anstieg der [Ca²⁺]_i, welcher über Aktivierung calciumabhängiger Chlorid- und Kaliumkanäle die Vasomotion begünstigt (1).

Aus meinen Daten geht hervor, dass die durchschnittliche Häufigkeit des Auftretens von Oszillationen mit sinkendem Sauerstoffgehalt in Perfusionslösung und Organbad zunimmt. Die mittlere Amplitude der Durchmesser-Oszillationen nimmt mit sinkendem Sauerstoffgehalt zu.

5.3) Hypoxische Vasodilatation im mesenterialen Gefäßbett der Maus und Grad der Hypoxie

Im Gegensatz zur pulmonalen Strombahn, in der Hypoxie eine Vasokonstriktion auslöst, dilatieren Gefäße des systemischen Kreislaufes bei Hypoxie, um durch erhöhten Fluss eine ausreichende Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff zu ermöglichen (39,118).

Die vorliegende Studie zeigt deutlich, dass Segmente zweiter Ordnung der Arteria mesenterica superior der Maus bei zunehmender Hypoxie häufiger dilatieren. Während bei milder Hypoxie von 14,4% Sauerstoffgehalt die Hälfte der Arteriensegmente der Kontrollgruppe mit einer Konstriktion reagierte, die signifikant unterschiedlich zum Ausgangsdurchmesser war, stieg der Anteil der dilatierenden Arteriensegmente an der Gesamtgruppe mit zunehmender Hypoxie. Die Vasomotorik der Arteriensegmente, die dilatierten, war bei 12,2% und 2,7% Sauerstoff signifikant unterschiedlich zum Ausgangsdurchmesser (siehe Kapitel 4.1).

Welche Mechanismen hinter der hypoxischen Vasodilatation stecken ist noch nicht umfassend geklärt. Eine Theorie ist, dass durch den Sauerstoffmangel die oxidative Phosphorylierung von ADP zu ATP gedrosselt wird. Die intrazelluläre ATP-Konzentration ($[ATP]_i$) sinkt und die ATP-abhängige Bindung der Actin- und Myosin-Filamente nimmt ab. Folglich kann die Muskelzelle nicht mehr kontrahieren (siehe Abbildung 28). Für glatte Muskelzellen des unteren Gastrointestinaltraktes ist dieser Mechanismus der Hypoxie-induzierten Relaxation sehr wahrscheinlich (58,87).

In VSMC von Koronararterien wurde gezeigt, dass der ATP-Mangel auch zur Öffnung von K_{ATP} -Kanälen und damit zur Hyperpolarisation der Zellmembran führt. Durch die Hyperpolarisation kommt es zu einer Hemmung des Calciumeinstromes durch Ca_v und zur Relaxation der VSMC (29). Für das mesenteriale Stromgebiet ist dieser Mechanismus der Vasodilatation theoretisch auch möglich, denn in Mesenterialarterien von Ratten wurden K_{ATP} -Kanäle nachgewiesen (107).

Die $[ATP]_i$ scheint nicht in jedem Fall das richtige Maß für den Energiehaushalt der Zelle zu sein. Shimizu et al. maßen in VSMCs von Schweine-Koronararterien keinen Hypoxie-induzierten Abfall der $[ATP]_i$, wohl aber einen Anstieg der ADP-Konzentration (104). Die Relation von Phosphocreatinin bzw. intrazellulärem Phosphat zu $[ATP]_i$ bzw.

der Creatininkonzentration erscheint im Hinblick auf den zellulären Energiehaushalt aussagekräftiger zu sein (69).

Als Folge der Hypoxie tritt häufig eine Verringerung des pH-Wertes auf. Die Azidose resultiert zum einen aus dem Anfall von Laktat aus der anaeroben Glykolyse und zum anderen aus der Hemmung der mitochondrialen Atmungskette und der damit verbundenen verringerten Aktivität der Protonenpumpe. Auch eine verminderte Aktivität des Natrium-Protonen-Austauschers der Zellmembran als Folge der verminderten Na^+/K^+ -ATPasen Aktivität kommt als weiterer Faktor dazu (69).

Hypoxie-induzierte Azidose kann zu einer Calcium-Desensitivierung und folglich zu einer Relaxation der VSMC führen (85,104) (siehe Abbildung 28).

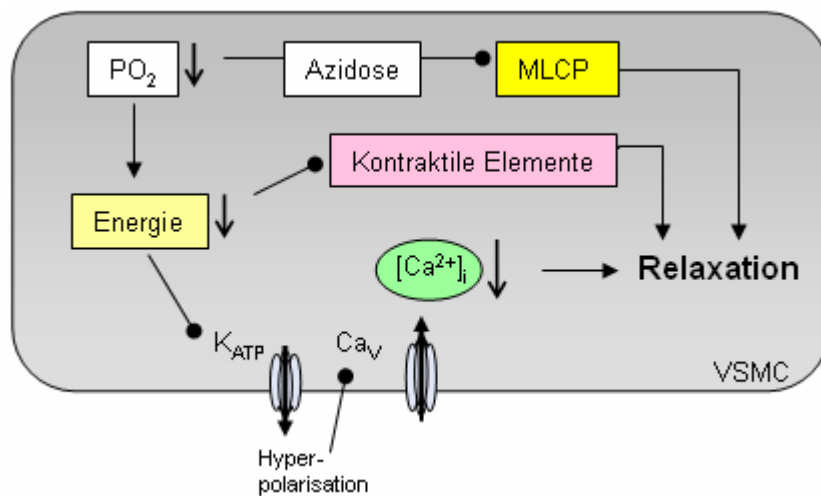


Abbildung 28: Schematische Zusammenfassung der Thesen zur hypoxischen Vasodilatation.

Der sinkende Sauerstoffpartialdruck (PO_2) führt durch Hemmung der MLCP zur Calcium-Desensitivierung und Relaxation der VSMC. Außerdem sinkt durch die Hypoxie der Energie-/ATP-Gehalt der Zelle (Energie), was zum einen die Bindung der kontraktile Elemente hemmt und zum anderen über Aktivierung des K_{ATP} -Kanals zu Hyperpolarisation durch Kaliumausstrom und resultierendem Schließen von Ca_v -Kanälen zum Sinken der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und zur Relaxation führt.

5.4) Rolle des TASK1-Kanals bei der Hypoxie-induzierten Vasomotorik

Tandemporen-Kaliumkanäle, wie der TASK1-Kanal, spielen bei der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials eine große Rolle. Ihre Leitfähigkeit wird durch metabolische Einflüsse (wie dem extrazellulären pH-Wert) und durch andere Substanzen, wie zum Beispiel Lokal- und Allgemeinanästhetika moduliert. Es existieren bislang nur Einzelberichte über die selektive Blockade von Tandemporen-Kaliumkanälen. A293 wurde als selektiver Blocker des TASK1-Kanals in Herzmuskelzellen der Ratte verwendet (93). Aufgrund der spärlichen Datenlage zu selektiven Hemmstoffen der Tandemporen-Kaliumkanäle wurden in der vorliegenden

Studie TASK1^{-/-} Mäuse verwendet, um den Einfluss des TASK1-Kanales auf die Hypoxie-induzierte Vasomotorik im mesenterialen Stromgebiet der Maus zu untersuchen.

Bei TASK1^{-/-} Mäusen zeigte sich im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen bei allen Hypoxie-Stufen eine verminderte Dilatation. Die Konstriktion der Arteriensegmente von TASK1^{-/-} Mäusen war bei hypoxischen Sauerstoffkonzentrationen von 12,2% und 2,7% stärker als die der Kontrollgruppe.

Tandemporen-Kaliumkanäle, wie zum Beispiel der TASK1-Kanal, sind auch in Ruhe geöffnet. Der Fluss durch diese Kanäle erfolgt entlang des Konzentrationsgradienten nach extrazellulär. Bei TASK1^{-/-} Mäusen ist es denkbar, dass die Funktion des TASK1-Kanales von anderen K_{2P}-Kanälen übernommen wird. In einer Studie von Aller et al. konnte zwar im Cerebellum von TASK1^{-/-} Mäusen keine veränderte Expression von K_{2P} Kanälen festgestellt werden, die so genannte Leck-Leitfähigkeit für Kalium wurde bei TASK1^{-/-} Mäusen jedoch von TASK3-Kanälen kompensiert (5). TASK3 wird jedoch zumindest in Mesenterialarterien von Ratten nicht exprimiert (44). Studien, die das Vorkommen des TASK3-Kanals in der Mesenterialarterie von TASK1^{-/-} Mäusen untersuchen, könnten über eine mögliche Kompensation des fehlenden TASK1-Kanales durch den TASK3-Kanal mehr Klarheit bringen.

Trotzdem die verringerte Intensität der Dilatation der Mesenterialarteriensegmente von TASK1^{-/-} Mäusen nicht signifikant unterschiedlich zur Vasomotorik der Wildtyp-Mäuse war, kann der Einfluss des TASK1-Kanales wie folgt erklärt werden (siehe Abbildung 29):

In Zellkulturen von Glomus caroticum Zellen von Ratten konnte gezeigt werden, dass die Leitfähigkeit des TASK1-Kanals nicht nur vom pH-Wert, sondern auch durch Veränderungen des Sauerstoffpartialdruckes beeinflusst wird. Hypoxie führt zu einer Hemmung des Kalium-Auswärts-Flusses durch den TASK1-Kanal und damit zur Depolarisation der Glomerulus-Zellen (19).

Weiterhin kann auch intrazelluläre Azidose, wie sie bei Hypoxie entsteht, den Fluss durch den TASK1-Kanal hemmen und zu einer Depolarisation führen. Diese Depolarisation bewirkt ein Öffnen von Ca_v und es kommt zum Calciumeinstrom (19). In vaskulären EC sind Ca_v im Allgemeinen nicht vorhanden und tragen in EC auch nicht zum Calciumeinstrom von extrazellulär bei. In terminalen Arteriolen von Ratten-Mesenterialarterien (Durchmesser 24 ± 1 µm) wurde jedoch das Vorhandensein von Ca_{v3.2} in EC nachgewiesen (14). Dort ist ein spannungsabhängiger Calciumeinstrom möglich.

In VSMC dagegen sind Ca_v exprimiert, der dominierende Kanaltyp ist Ca_{v1.2} (L-Typ-Calciumkanal). In VSMC triggert die Depolarisation einen Calciumeinstrom durch Ca_v

Kanäle. Der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in der VSMC kann durch MEGJ an die EC weitergegeben werden und auch in der EC zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ führen.

Die erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ der EC triggert das Öffnen von SK_{Ca} bzw. IK_{Ca} und es kommt zu einer Hyperpolarisation der EC. Die Hyperpolarisation der EC ist wesentlicher Bestandteil des EDHF-Signalweges, wobei der TASK1-Kanal eventuell eine Rolle spielt.

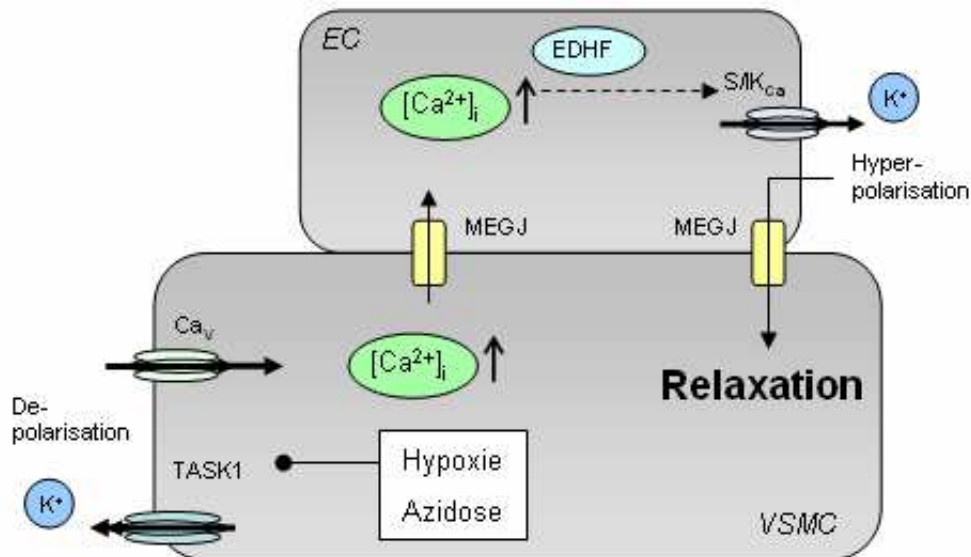


Abbildung 29: Mögliche Involvierung des TASK1-Kanals bei Hypoxie

Hypoxie und Azidose hemmen den Kalium-Ausstrom durch den TASK1-Kanal. Die resultierende Depolarisation führt zum Calciumeinstrom in die VSMC. Calciumionen gelangen über MEGJ in die EC. Der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in der EC führt zum Öffnen von SK_{Ca} Kanälen. Die resultierende Hyperpolarisation wird von der EC in die VSMC über MEGJ weitergeleitet und es kommt zur Relaxation.

Falls der TASK1-Kanal in EC bei Hypoxie zum Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ führt, kann die verminderte Dilatation bei $TASK1^{-/-}$ Mäusen dadurch erklärt werden, dass die Calcium-abhängigen endothelvermittelten Dilatationen bei $TASK1^{-/-}$ Mäusen geringer ausfallen als bei Wildtyp-Mäusen.

Bislang wurde lediglich RNA des TASK1-Kanals in Segmenten der gesamten Mesenterialarterie von Ratten nachgewiesen (44). Weitere Studien, die zeigen ob TASK1 nur in ECs und/oder in VSMCs von Mesenterialarterien exprimiert ist und ob sich die $[Ca^{2+}]_i$ in EC oder VSMC bei $TASK1^{-/-}$ Mäusen verändert, sind zur Klärung der genauen Rolle des TASK1-Kanals bei der Hypoxie-induzierten Vasomotorik nötig.

5.5) Einfluss von Calcium auf die Hypoxie-induzierte Vasomotorik

Von der Versuchsgruppe, bei der calciumfreie Tyrode-Lösung verwendet wurde,

dilatierten bei Hypoxie anteilig mehr Arteriensegmente als in calciumhaltiger Tyrode-Lösung. Die Intensität der Dilatationen war in calciumfreier Lösung geringer als in der Kontrollgruppe.

Der Calciumhaushalt der Zellen ist komplex reguliert (siehe Abbildung 30). EC und VSMC haben gemein, dass der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ sowohl von extrazellulär, als auch aus intrazellulären Speichern erfolgt.

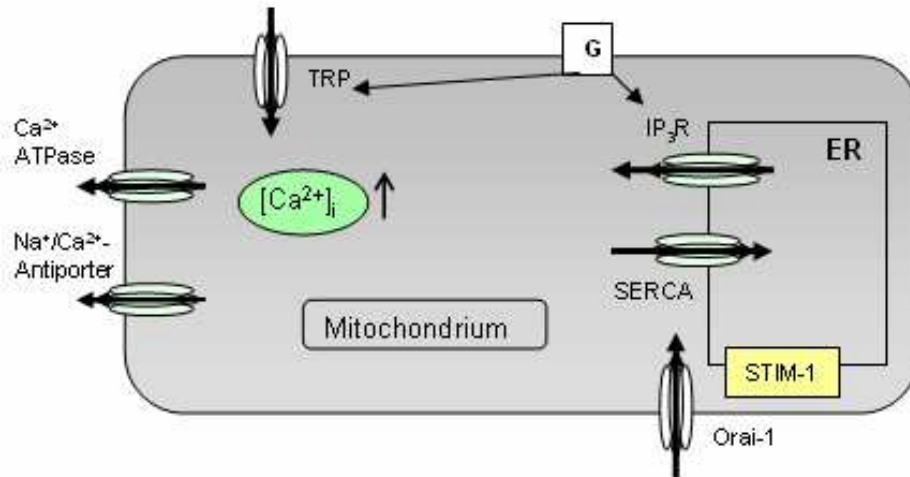


Abbildung 30: Calciumhaushalt der Endothelzelle

In EC kann extrazelluläres Calcium durch TRP-Kanäle nach intrazellulär strömen. Intrazelluläre Calciumspeicher sind Mitochondrien und das ER. Wenn die intrazellulären Speicher leer sind, wird das stromal interacting molecule-1 (STIM-1) aktiviert, welches zu einer Anlagerung des ER an das kanalbildende Protein Orai-1 der Plasmamembran führt. Wegen der extrazellulär höheren Calciumkonzentration, kann Calcium nach intrazellulär fließen. Durch die Nähe des ER zu der lokalisierten erhöhten $[Ca^{2+}]$ pumpt die SERCA das Calcium in das ER und füllt es so auf (8,36).

In der Plasmamembran sind Calciumtransporter, wie die Ca²⁺-ATPase und der Na⁺/Ca²⁺-Antiporter lokalisiert, die Calcium nach extrazellulär transportieren.

In VSMC fließt der Großteil des Calciums von extrazellulär durch Ca_v nach intrazellulär, ein kleinerer Teil durch TRP-Kanäle. Als intrazelluläre Speicher dienen primär das SR und die Mitochondrien. Die Auffüllung des SR über Aktivierung des STIM-1 findet auf gleichem Weg wie in EC statt (36).

Calciumfreie Tyrode-Lösung in der Perfusionslösung und dem Organbad führt zu einer Umkehr des Konzentrationsgradienten für Calcium zwischen Intra- und Extrazellularraum. Normalerweise ist die $[Ca^{2+}]_i$ sehr gering (100-200 nMol/l) und die extrazelluläre Calciumkonzentration, bzw. hier die der calciumhaltigen Tyrode-Lösung, höher (2,5 mMol/l). Durch diesen Konzentrationsgradienten wird die oben beschriebene Sequestration von Calcium in intrazelluläre Speicher möglich. In calciumfreier Tyrode-Lösung fehlt der physiologische Konzentrationsgradient des Calciums. Die intrazellulären Speicher können nicht von extrazellulär aufgefüllt werden und leeren sich langsam. Das Calcium, welches bei erhöhter $[Ca^{2+}]_i$ durch die Ca²⁺-

ATPase und über $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter nach extrazellulär gepumpt wird, wird durch den konstanten Fluss der calciumfreien Lösung sofort ausgewaschen. Netto ist weniger Calcium in der VSMC vorhanden, was zu einem Überwiegen der Relaxation gegenüber der Kontraktion führt. Deshalb ist der Anteil der Arteriensegmente, die bei Hypoxie dilatieren, in calciumfreier Lösung höher als in calciumhaltiger Lösung.

Calcium kann durch MEGJ zwischen EC und VSMC diffundieren, dementsprechend wird die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der VSMC durch Calcium aus der EC aufgefüllt. Wegen der durch diesen Mechanismus sinkenden $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in der EC sind endothelvermittelte calciumabhängige Dilatations-Signalwege, wie der NO-, PGI_2 - und EDHF-Signalweg, gedrosselt. Die vergleichsweise geringere Intensität der Dilatation in calciumfreier Tyrode-Lösung im Gegensatz zu calciumhaltiger Tyrode-Lösung ist wahrscheinlich ein Effekt der verminderten calciumabhängigen Signalwege des Endothels.

Die Aktivität der eNOS ist abhängig von der Calmodulin-Bindung an das Enzym (36). Die Calmodulin-Bindung wird erst bei einem Anstieg des intrazellulären Calciumgehalts möglich (97). Dieser kann bei fehlendem extrazellulärem Calcium eventuell durch die Leerung intrazellulärer Speicher der EC erklärt werden. Durch Phosphorylierungen kann die Bindung von Calmodulin an die eNOS erleichtert und schon bei geringeren intrazellulären Calciumkonzentrationen gewährleistet werden (36,97).

Weitere Studien, in denen Mesenterialarteriensegmente von $\text{eNOS}^{-/-}$ Mäusen oder von Ratten ohne Endothel unter Verwendung von calciumfreier Lösung untersucht werden, könnten hier weitere Erkenntnisse beitragen.

Hemmung des Calciumeinstromes von extrazellulär mittels NiCl_2 führt zur hypoxischen Vasokonstriktion. Diese Konstriktion ist in ihrer Intensität stärker als die hypoxische Konstriktion der Kontrollgruppe ohne Zugabe von NiCl_2 und nimmt mit sinkender Sauerstoffkonzentration zu.

Dieses Ergebnis war nicht zu vermuten, denn NiCl_2 blockiert den Calciumeinstrom von extrazellulär durch Ca_v (60). Ca_v sind in VSMC hauptverantwortlich für den Calciumeinstrom von extrazellulär. Eine Hemmung des Calciumeinstromes in die VSMC führt zu einer verminderten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und zur Relaxation. In dieser Studie haben sich jedoch alle Arteriensegmente unter Zugabe von NiCl_2 bei Hypoxie konstringiert. Das lässt den Schluss zu, dass für diese Konstriktion Calcium aus intrazellulären Speichern der VSMC bereitgestellt wird, denn auf diese hat NiCl_2 keinen Einfluss (60). Außerdem scheinen Ca_v für die hypoxische Vasodilatation wichtig zu sein, denn durch ihre Blockade mittels NiCl_2 wird die hypoxische Vasodilatation aufgehoben.

Aufgrund der extrazellulär höheren Calciumkonzentration strömt Calcium nicht nach extrazellulär. Die Calciumelimination nach einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wird zum Großteil

durch die membranständige Ca^{2+} -ATPase gewährleistet. Zu einem kleinen Teil wird Calcium in intrazelluläre Speicher sequestriert.

In VSMC von Kaninchenarterien führt Hypoxie als alleiniger Faktor zu einem Stopp des Calciumeinstroms durch L-Typ-Calciumkanäle und trägt so zur hypoxischen Vasodilatation bei (41). Da NiCl_2 in Mesenterialarterien von Mäusen den Calciumeinstrom durch Ca_v blockiert und zu einer hypoxischen Vasokonstriktion führt, müssen für die Konstriktion andere Mechanismen eine Rolle spielen.

Zum Beispiel könnte NiCl_2 eine Wirkung auf Calciumkanäle von EC haben. Da in terminalen mesenterialen Arteriolen von Ratten Ca_v in EC vorhanden sind (14), ist es denkbar, dass diese in Arteriensegmenten von Mäusen schon in größeren Arterien existieren und dort zum Calciumeinstrom in die EC beitragen. Unter dieser Annahme würde NiCl_2 einen Teil des Calciumeinstroms in die EC verhindern, was zu einer Reduktion der Hypoxie-induzierten endothelabhängigen calciumvermittelten Dilatationen führt und somit zu einem Überwiegen der Vasokonstriktion. Das würde bedeuten, dass die Hypoxie-induzierte Vasodilatation an sich stark von calciumabhängigen endothelvermittelten Signalwegen abhängt.

Es wird in der Literatur immer wieder über einen Calcium-Leckstrom in die EC diskutiert. Nach Hyperpolarisation der EC wird ein Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beobachtet. Dieser Anstieg könnte durch Verstärken des Calciumflusses durch bereits geöffnete Calciumkanäle zu Stande kommen, oder eventuell durch Kanäle, die durch Hyperpolarisation und zyklische Nukleotide aktiviert werden (HCN-Kanäle) und für Calcium durchlässig sind (31).

NiCl_2 hat hier eventuell einen Wirkungsort und könnte über diesen Weg den Calciumeinstrom in die EC hemmen.

5.6) Einfluss von NO auf die Hypoxie-induzierte Vasomotorik

Mesenterialarterien von Mäusen, bei denen das Gen der eNOS ausgeschaltet wurde, reagierten mit verminderter Dilatation auf Hypoxie. Die Anzahl der dilatierenden Arteriensegmente und die Intensität der Dilatationen nahmen mit sinkender Sauerstoffkonzentration zu. Bei 12,2% und 2,7% Sauerstoffgehalt der Perfusionslösung und des Organbades waren die Dilatationen der Arteriensegmente von $\text{eNOS}^{-/-}$ Mäusen signifikant unterschiedlich zum Ausgangsdurchmesser.

Das bedeutet, dass endothelial synthetisiertes NO zwar Einfluss auf die Hypoxie-induzierte Vasodilatation hat, aber nicht einziger Auslöser der Dilatation ist. Es gibt hierfür mehrere Erklärungsansätze:

1.) Die Funktion der eNOS könnte von anderen NOS-Isoformen kompensiert werden.

Es gibt gegensätzliche Studien zur Kompensation der Funktion der eNOS: Eine Arbeitsgruppe berichtet, dass das Fehlen der eNOS von anderen NOS Isoformen (induzierbare NO-Synthase (iNOS) oder neuronale NO-Synthase (nNOS)) kompensiert wird (Gehirngefäße der Maus (82)). Andere Arbeitsgruppen konnten dies nicht feststellen (Lungengefäße der Maus (34); Aorta der Maus (55)). Für Mesenterialarterien von Mäusen gibt es zu einer möglichen Kompensation der eNOS bei eNOS^{-/-} Mäusen bisher noch keine Daten.

Hypoxie an sich führt dazu, dass die Expression der nNOS in VSMC erhöht wird (53). Dies ist jedoch unabhängig vom Vorhandensein der eNOS.

2.) NO kann von anderen Quellen als NOS-Isoformen bereitgestellt werden.

In vivo kann NO an Hämoglobin gebunden über die Erythrozyten in die Gefäßwand gelangen, dort bei Hypoxie freigesetzt werden und zur Vasodilatation führen (4). In meiner Studie ist diese NO Quelle ausgeschlossen, da die Arteriensegmente mit zellfreier Tyrode-Lösung perfundiert wurden.

Myoglobin aus den VSMC kann Nitrit (NO₂⁻) aus der Gefäßwand zum aktiven NO[•] reduzieren und somit unabhängig von NOS-Isoformen zur Bereitstellung von NO für den dilatierenden Signalweg über die sGC beitragen (111).

Die Reduktion von Nitrit zu aktivem NO[•] kommt auch spontan und unabhängig von Enzymen (wie der Cytochrom c Oxidase, CcO) vor. Je niedriger der pH-Wert des Gewebes ist, desto mehr NO kann über diesen Weg bereitgestellt werden (119).

3.) Durch Fehlen von molekularem Sauerstoff kann die NOS bei Anoxie kein NO synthetisieren und ist deshalb bei der Hypoxie-induzierten Vasomotorik ohnehin nicht stark involviert.

Die NO-Synthese durch die eNOS ist von molekularem Sauerstoff abhängig (71,97). Ohne diesen kann die NOS kein NO synthetisieren. Demnach müsste es bei Hypoxie zu einer Drosselung der NO-Synthese kommen. Für das pulmonale Gefäßbett ist dieser Effekt beschrieben (68).

Es gibt Studien, in denen gezeigt wurde, dass die NO-Synthese unter Hypoxie zunimmt (beispielsweise: in Mesenterialarterien von Ratten (86,92), in Femoralarterien bzw. Aortensegmenten von Kaninchen (92)).

Ich konnte zeigen, dass sowohl der prozentuale Anteil der dilatierenden Arteriensegmente an der Gesamtzahl, wie auch die Intensität der Dilatationen bei eNOS^{-/-} Mäusen geringer war, als bei Wildtyp-Mäusen. Diese Werte waren nicht signifikant unterschiedlich voneinander, dennoch ist der beschriebene Trend erkennbar.

Das heißt, dass endotheliales NO sehr wohl eine Rolle bei der hypoxischen Vasodilatation spielt, wenn auch nicht der alleinige Faktor zu sein scheint. Auch wäre es möglich, dass es abhängig vom Grad der Hypoxie zum Überwiegen des NO- oder eines anderen Signalweges kommt.

4.) NO sorgt für eine Bereitstellung von Sauerstoff indem es die Cytochrom c Oxidase in der Mitochondrien-Membran inhibiert.

NO und molekularer Sauerstoff konkurrieren um die Bindung an die CcO, dem terminalen Enzym der mitochondrialen Atmungskette. Sauerstoff wird von der CcO zu Wasser reduziert. Dabei wird der für die Atmungskette nötige Protonengradient über der Mitochondrienmembran aufgebaut.

Bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen kann endothelial generiertes NO molekularen Sauerstoff aus seiner Bindung zur CcO verdrängen und so die Funktion der CcO inhibieren. Der molekulare Sauerstoff steht dann für das Gewebe zur Verfügung (114). Da die NOS molekularen Sauerstoff zur Synthese von NO benötigt, kann durch diesen Mechanismus weiteres NO synthetisiert werden.

5.) Ein anderer Faktor als NO ist für die Hypoxie-induzierte Vasodilatation verantwortlich.

Endotheliales NO wurde lange Zeit für den wesentlichen Faktor der hypoxischen Vasodilatation gehalten. Aus meinen Daten geht hervor, dass die Hypoxie-induzierte Dilatation bei eNOS^{-/-} Mäusen zwar seltener und in ihrer Intensität geringer war, als bei Wildtyp-Mäusen. Trotz fehlendem endothelialem NO waren jedoch die Dilatationen der Arteriensegmente von eNOS^{-/-} Mäusen bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen (12,2% und 2,7%) signifikant unterschiedlich zum Ausgangsdurchmesser. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass NO zwar eine Rolle bei der hypoxischen Vasodilatation spielt, jedoch nicht der hauptverantwortliche dilatierende Faktor bei Hypoxie ist.

Neben NO stehen aus dem Endothel noch Prostaglandin-Derivate und der EDHF als vasodilatierende Faktoren zur Verfügung.

In Mesenterialarterien von Wildtyp-Mäusen konnte gezeigt werden, dass dilatierende Signalwege über NO und COX-Derivate bestehen. Der EDHF-Signalweg spielt unter physiologischen Bedingungen jedoch keine Rolle. Es wurde vermutet, dass der EDHF-Signalweg zur Kompensation des fehlenden NO bei eNOS^{-/-} Mäusen hochreguliert wird. Chataigneau et al. zeigten, dass das jedoch nicht der Fall ist (23). Für hypoxische Bedingungen ist ein möglicher Einfluss des EDHF-Signalweges noch nicht bewiesen oder widerlegt.

In Zellkulturen von Endothelzellen aus der Rinder-Aorta konnte gezeigt werden, dass

zwischen Prostaglandinen und NO ein negativer Feedback-Mechanismus besteht. COX-Derivate, wie PGI₂, werden bei Hypoxie synthetisiert und hemmen in der EC die NO-Synthese (116). Die signifikante Hypoxie-induzierte Vasodilatation könnte Resultat des PGI₂ Signalweges sein. Die Stärke des Einflusses von Prostaglandinen auf die Hypoxie-induzierte Vasomotorik der Arteria mesenterica der Maus ist bislang noch nicht untersucht.

Otter und Austin haben 1999 herausgefunden, dass die hypoxische Vasodilatation im mesenterialen Stromgebiet der Ratte weder von endothelialem NO, noch von Prostaglandinen abhängig ist. Auch den Einfluss eines hyperpolarisierenden Faktors (EDHF) hielten Otter und Austin für unwahrscheinlich, da die Hypoxie-induzierten Dilatationen auch nach Entfernung des Endothels auftraten (88).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass endotheliales NO zwar zur hypoxischen Vasodilatation im mesenterialen Gefäßbett beiträgt, jedoch nicht der einzige Faktor ist. Die Rolle von COX-Derivaten und dem EDHF für die Hypoxie-induzierte Vasomotorik ist für das mesenteriale Gefäßbett der Maus bislang noch nicht ausreichend untersucht.

Kürzlich wurde ein weiterer Faktor für die hypoxische Vasodilatation in Mesenterialarterien von Ratten identifiziert – Dopamin, welches von EC synthetisiert werden kann (91). Weitere Studien hierzu sind notwendig, um den genauen Mechanismus der hypoxischen Vasodilatation im mesenterialen Gefäßbett zu verstehen.

Ein direkter dilatierender Einfluss der Hypoxie auf die VSMC, zum Beispiel durch Beeinflussung der Calciumsensitivität, ist auch denkbar.

6) Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Regulation der Vasomotorik unter Sauerstoffmangel im mesenterialen Gefäßbett der Maus. Während es zahlreiche Studien zur Hypoxie-induzierten Vasomotorik in anderen Gefäßbetten gibt, ist die Datenlage für das intestinale Gefäßbett - trotz der klinischen Relevanz der mesenterialen Hypoxie - eher gering. Auch wurde bisher in der Hauptsache an Ratten geforscht. In meiner Studie wurden Mäuse verwendet, um ein Modell zu etablieren, welches die Verwendung von Knockout-Tieren ermöglicht.

Ziel der Arbeit war es zu zeigen, wie sich die Vasomotorik der Arteria mesenterica superior der Maus grundsätzlich unter Hypoxie verhält und ob sie vom Grad der Hypoxie abhängt. Außerdem sollte der Einfluss bestimmter Signalmoleküle wie NO und Calcium auf die Hypoxie-induzierte Vasomotorik untersucht werden. Mit Hilfe von TASK1^{-/-} Mäusen sollte der Stellenwert dieses Tandemporen-Kaliumkanals, der zur Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials wichtig ist, gezeigt werden.

Die Mesenterialarterien von männlichen Mäusen wurden entnommen und unter dem Mikroskop freipräpariert. Ein 2-4 mm langes Segment der Mesenterialarterie zweiter Ordnung wurde abgeschnitten und in der Durchfluss-Messkammer des Arteriographen kanüliert. In der Durchfluss-Messkammer wurde das Arteriensegment kontinuierlich mit der Versuchslösung mit konstantem Druck perfundiert und gleichzeitig von der Versuchslösung umspült. Es wurden calciumhaltige oder -freie Tyrodelösungen mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen verwendet. Das Arteriensegment in der Durchfluss-Messkammer wurde gefilmt und der Durchmesser kontinuierlich videomorphometrisch ermittelt und aufgezeichnet.

Die Arteria mesenterica superior der Maus neigt bei Hypoxie zur Dilatation. Diese Dilatation ist im calciumfreien Milieu deutlich ausgeprägter als in der Kontrollgruppe mit calciumhaltiger Tyrode-Lösung. Hemmung des Calciumeinstromes von extrazellulär mittels NiCl₂ führt zur hypoxischen Vasokonstriktion. Mesenterialarterien von eNOS^{-/-} Mäusen reagieren mit verminderter Dilatation auf Hypoxie, die Dilatation ist jedoch signifikant. Bei TASK1^{-/-} Mäusen zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verminderte Dilatation. Die Konstriktion der Arteriensegmente von TASK^{-/-} Mäusen bei milder Hypoxie ist stärker als die der Kontrollgruppe.

Bei allen Versuchsreihen sind Oszillationen des Gefäßdurchmessers aufgetreten. Der Anteil an der Versuchszeit, in der Oszillationen auftreten, steigt mit zunehmender Hypoxie und ist in calciumfreier Lösung am höchsten.

Ein wichtiges Signalmolekül für die Hypoxie-induzierte Vasomotorik ist endotheliales

NO. Das Auftreten einer signifikanten Hypoxie-induzierten Vasodilatation bei eNOS^{-/-} Mäusen ist jedoch ein Indikator für den wesentlichen Einfluss weiterer Signalmoleküle oder eventuell des direkten Einwirkens der Hypoxie auf die VSMC.

Die verminderte Intensität der Vasodilatation in Ca²⁺-freier Lösung kann einerseits durch eine veränderte Endothelfunktion, andererseits durch veränderte Ca²⁺-abhängige Mechanismen der VSMC bedingt sein.

Die Hypoxie-induzierte Vasodilatation im mesenterialen Gefäßbett der Maus wirkt protektiv und wird von extrazellulärem Calcium und endothelial generiertem NO beeinflusst. Weitere Determinanten der Hypoxie-induzierten Vasomotorik müssen intensiv erforscht werden, um den Mechanismus dieser Gefäßantwort umfassend zu verstehen.

7) Summary

The present study addresses the regulation of vasomotion of the murine mesenteric artery under hypoxic conditions. While there are numerous studies about hypoxia-induced vasomotion in other vascular beds, the data record for the intestinal vascular bed is – instead of the clinical relevance of mesenteric hypoxia- rather poor. Also, as yet, research was mainly focussed on rats. In my survey mice were used to establish an experimental model that allows the use of knockout-animals.

The aim of this study was to investigate how the vasomotion of the small mesenteric arteries of mice is altered in general under hypoxic conditions and whether these changes depend on the grade of hypoxia. In addition the influence of signal molecules like NO or calcium on the hypoxia-induced vasomotion ought to be investigated. By means of TASK1^{-/-} mice the significance of this two-pore-domain potassium channel, that is important for maintenance of the resting membrane potential, was demonstrated.

The mesenteric arteries of male mice were isolated by dissection from adhesive tissue under a stereo microscope. An arterial segment, 2-4 mm in length, of second order vessels from the mesenteric arcade was cut off and cannulated in an experimental chamber of the arteriograph. The arterial segment was perfused continuously and with constant pressure with experimental solutions and was bathed within the experimental solution. For the experimental solutions tyrode-ringer solution was used that varied in their calcium-contents and were adjusted to different oxygen concentrations.

The artery segment at the experimental chamber was filmed and the diameter was continuously measured by videomorphometry and was recorded.

The murine superior mesenteric artery tends to dilate under hypoxia. This dilation is more distinct in calcium-free environment than in the control group with calcium-containing tyrode-solution. Inhibition of calcium influx from extracellular with the means of NiCl₂ leads to hypoxic vasoconstriction.

Mesenteric arteries from eNOS^{-/-} mice show reduced dilation to hypoxia, the dilation is however significant.

TASK1^{-/-} mice show reduced dilation compared to the control group. The constriction of the TASK1^{-/-} arterial segments is at mild hypoxia stronger than the one of the control group.

In every experimental series oscillations of the vessel diameter appeared. The percentage of the experimental period, in which oscillations occurred, rose with increasing hypoxia and is the highest in calcium-free solution.

Summary

An important signal molecule for hypoxia-induced vasomotion is endothelial derived NO. The occurrence of a significant hypoxia-induced vasodilation at eNOS^{-/-} mice is an indicator for the substantial influence of other signal molecules or potentially the direct influence of hypoxia to the VSMC.

The reduced intensity of vasodilation in calcium-free solution can on the one hand be the result of altered endothelial function or on the other hand of altered calcium-dependent mechanisms in the VSMC.

The hypoxia-induced vasodilation at the murine mesenteric vascular bed acts protective and is influenced by extracellular calcium and endothelial generated NO. Further determinants of hypoxia-induced vasomotion have to be investigated, to understand the entire mechanism of this behaviour of the vessels.

8) Abkürzungsverzeichnis

[ATP] _i	Intrazelluläre ATP-Konzentration
[Ca ²⁺] _i	Intrazelluläre Calciumkonzentration
AA	Arachidonsäure
AC	Adenylatcyclase
ADP	Adenosindiphosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ATP	Adenosintriphosphat
BK _{Ca}	Ca ²⁺ -aktivierter Kaliumkanal mit breiter Leitfähigkeit
Ca ²⁺ -ATPase	ATP-abhängige Calciumpumpe
CaM	Calicum-Calmodulin-Komplex
Ca _v	Spannungsabhängiger Calciumkanal
CcO	Cytochrom c Oxidase
CGKI	cGMP-abhängige Kinase
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
Cl _{Ca}	Calcium-aktivierter Chloridkanal
CPI-17	PKC-potentiated Protein-phosphatase-1 Inhibitor Protein
COX	Cyclooxygenase
DAG	Diacylglycerol
EC	Endothelzelle
EDHF	Endothelium-Derived-Hyperpolarizing-Factor
EDRF	Endothelium-Derived-Relaxing-Factor
EETs	Epoxyeicosatriensäuren
EGTA	Ethylenglykol-bis(amino-ethylether)-N,N,N'-tetraessigsäure)
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
eNOS ^{-/-}	eNOS-Knockout-Mäuse
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ET-1	Endothelin-1
ET(A)/(B)	Endothelin-Rezeptor A/B
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ S	Hydrogensulfat

Abkürzungsverzeichnis

HCN-Kanal	Hyperpolarizations-aktivierter zyklisches Nukleotid-gesteuerter Kanal
HIF-1	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1
Hsp 90	Heat Shock Protein 90
IK _{Ca}	Calcium-aktivierter Kaliumkanal von mittlerer Leitfähigkeit
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
IP ₃	Inositoltriphosphat
IP ₃ R	Inositoltriphosphat-Rezeptor
K _{2P}	Tandemporen-Kaliumkanal
K _{ATP}	ATP-abhängige Kaliumkanäle
K _{Ca}	Calcium-aktivierter Kaliumkanal
KCl	Kaliumchlorid
K _{IR}	Einwärts gleichrichtende Kaliumkanäle
K _v	Spannungsabhängiger Kaliumkanal
MAPK	Mitogen-activated-Proteinkinasen
MEGJ	Myoendotheliale Gap-Junction
MLCK	Myosin-Leichtketten-Kinase
MLCP	Myosin-Leichtketten-Phosphatase
NiCl ₂	Nickelchlorid
nNOS	Neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS3	Endotheliale NO-Synthase
PE	Phenylephrin
PG	Prostaglandin
PGI ₂	Prostaglandin I ₂ (=Prostazyklin)
PI3-Kinase	Phospho-Inositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PL	Phospholipase
PLC	Phospholipase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RyR	Ryanodinrezeptor
SEM	Standard Error of the Mean; Standardfehler
SERCA	Sarkoplasmatische-Retikulum-Ca ²⁺ -ATPase
sGC	Soluble (=lösliche) Guanylatcyclase

Abkürzungsverzeichnis

SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrom
SK _{Ca}	Calcium-aktivierter Kaliumkanale von kleiner Leitfähigkeit
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
STIM-1	Stromal Interacting Molecule-1
TASK	TWIK related acid-sensitive K ⁺ channel
TASK ^{-/-}	TASK-Knockout-Mäuse
THIK	Tandem-pore-domain halothane-inhibited K ⁺ channel
TOK1	Outward-rectifier potassium channel
TRAAK	TWIK related arachidonic acid stimulated K ⁺ channel
TREK	TWIK related K ⁺ channel
TRP-Kanal	Transient receptor potential-Kanal
TRPV4-Kanal	Transient receptor potential vallinoid type 4-Kanal
TWIK	Tandem of P domains in weak inward rectifier channel
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VSMC	Glatte Gefäßmuskelzelle

9) Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Calciumregulation in der Endothelzelle	3
Abbildung 2: NO-Signalweg von der Endothelzelle zur Gefäßmuskelzelle.....	5
Abbildung 3: Prostaglandin I ₂ -Signalweg	7
Abbildung 4: EDHF-Signalweg	8
Abbildung 5: Signalweg zur Auslösung einer Kontraktion in der glatten Gefäßmuskelzelle	10
Abbildung 6: Sternförmig aufgesteckter Darm der Maus.....	19
Abbildung 7: Schema des Messstandes.....	21
Abbildung 8: Messkammer auf dem Durchlichtmikroskop.....	22
Abbildung 9: Zeitlicher Versuchsablauf.....	23
Abbildung 10: Ermittlung der maximalen Konstriktion.....	24
Abbildung 11: Ermittlung der maximalen Dilatation	25
Abbildung 12: Sauerstoffpartialdruck in der Messkammer bei Perfusion mit unterschiedlich begasten Lösungen.	26
Abbildung 13: Sauerstoffpartialdruck in der Kammer unter Verwendung des Membranoxygenators.....	27
Abbildung 14: Prozentualer Anteil der dilatierenden Arteriensegmente, von der Gesamtzahl (n=10) der untersuchten Arteriensegmente in der Kontrollgruppe	31
Abbildung 15: Vasomotorik in der Kontrollgruppe (n=10) in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration.....	32
Abbildung 16: Prozentualer Anteil der dilatierenden Arteriensegmente.....	34
Abbildung 17: Vasomotorik in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration in calciumfreier Lösung	36
Abbildung 18: Vasomotorik in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration in nickelchloridhaltiger Tyrode-Lösung (n=6)	39
Abbildung 19: Prozentualer Anteil der dilatierenden Arteriensegmente.....	40
Abbildung 20: Vasomotorik der eNOS ^{-/-} Mäuse (n=8) in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration.....	42
Abbildung 21: Vasomotorik bei TASK1 ^{-/-} Mäusen in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration (n=4)	45
Abbildung 22: Abhängigkeit der Oszillationsamplitude der Durchmesserschwankung von der Sauerstoffkonzentration.....	47
Abbildung 23: Prozentualer Anteil der zeitlichen Phasen, in denen Oszillationen auftraten, an der Versuchszeit.....	49

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 24: Oszillationszeit als prozentualer Anteil der Versuchszeit	50
Abbildung 25: Vasomotorik aller Versuchsgruppen bei A 14,4% Sauerstoff und B 12,2% Sauerstoff	53
Abbildung 26: Vasomotorik aller Gruppen bei Hypoxie von 2,7% Sauerstoff in der Perfusionslösung und im Organbad.....	54
Abbildung 27: Zelluläre Mechanismen der Vasomotion in Mesenterialarterien der Ratte (modifiziert nach Rahman (95) und Aalkjaer (1))	57
Abbildung 28: Schematische Zusammenfassung der Thesen zur hypoxischen Vasodilatation.	60
Abbildung 29: Mögliche Involvierung des TASK1-Kanals bei Hypoxie	62
Abbildung 30: Calciumhaushalt der Endothelzelle	63

10) Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung Tyrode-Lösung	18
Tabelle 2: Zusammensetzung der Gase in den Flaschen	22
Tabelle 3: Zusammensetzung der calciumfreien Tyrode-Lösung	28
Tabelle 4: Messdaten der Kontrollgruppe	33
Tabelle 5: Messdaten der Vasomotorik in calciumfreier Tyrode-Lösung	37
Tabelle 6: Messdaten der Versuchsreihe mit nickelchloridhaltiger Lösung	38
Tabelle 7: Messdaten der Versuchsreihe mit eNOS ^{-/-} Mäusen	43
Tabelle 8: Messdaten der Versuchsreihe mit TASK1 ^{-/-} Mäusen	46
Tabelle 9: Vergleich der Mittelwerte aller Versuchsgruppen als % des Ausgangsdurchmessers	51
Tabelle 10: p-Werte des statistischen Vergleichs der Mittelwerte der Versuchsreihen gegeneinander	54

11) Literaturverzeichnis

1. Aalkjaer C, Boedtker D, Matchkov V. Vasomotion - what is currently thought? *Acta Physiol (Oxf)* 2011;202: 253-269.
2. Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR, et al. S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med* 2004; 10: 1200-1207.
3. Ali MH, Schlidt SA, Chandel NS, et al. Endothelial permeability and IL-6 production during hypoxia: role of ROS in signal transduction. *Am J Physiol* 1999; 277: L1057-L1065.
4. Allen BW, Stamler JS, Piantadosi CA. Hemoglobin, nitric oxide and molecular mechanisms of hypoxic vasodilation. *Trends Mol Med* 2009; 15: 452-460.
5. Aller MI, Veale EL, Linden AM, et al. Modifying the subunit composition of TASK channels alters the modulation of a leak conductance in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 2005; 25: 11455-11467.
6. Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, et al. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* 1999; 401: 282-286.
7. Barton M, Yanagisawa M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. *Can J Physiol Pharmacol* 2008; 86: 485-498.
8. Beech DJ. Orai1 calcium channels in the vasculature. *Pflugers Arch* 2012; 463: 635-647.
9. Bertuglia S, Giusti A. Role of nitric oxide in capillary perfusion and oxygen delivery regulation during systemic hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H525-H531.
10. Bolz SS, de WC, Pohl U. Endothelium-derived hyperpolarizing factor but not NO reduces smooth muscle Ca^{2+} during acetylcholine-induced dilation of microvessels. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 124-134.
11. Boo YC, Jo H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 285: C499-C508.
12. Borovik A, Golubinskaya V, Tarasova O, et al. Phase resetting of arterial vasomotion by burst stimulation of perivascular nerves. *J Vasc Res* 2005; 42: 165-173.
13. Boulanger C, Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 1990; 85: 587-590.
14. Braunstein TH, Inoue R, Cribbs L, et al. The role of L- and T-type calcium channels in local and remote calcium responses in rat mesenteric terminal arterioles. *J Vasc Res* 2009; 46: 138-151.
15. Brayden JE. Functional roles of K_{ATP} channels in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002; 29: 312-316.

16. Brett DS. Nitric oxide signaling specificity--the heart of the problem. *J Cell Sci* 2003; 116: 9-15.
17. Brouet A, Sonveaux P, Dessy C, et al. Hsp90 ensures the transition from the early Ca^{2+} -dependent to the late phosphorylation-dependent activation of the endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial growth factor-exposed endothelial cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 32663-32669.
18. Bryan RM, Jr., You J, Phillips SC, et al. Evidence for two-pore domain potassium channels in rat cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H770-H780.
19. Buckler KJ, Williams BA, Honore E. An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *J Physiol* 2000; 525 Pt 1: 135-142.
20. Busse R, Edwards G, Feletou M, et al. EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23: 374-380.
21. Busse R, Mulsch A. Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett* 1990; 265:133-136.
22. Buvinic S, Huidobro-Toro JP. Basal tonic release of nitric oxide coupled to cGMP production regulates the vascular reactivity of the mesenteric bed. *Eur J Pharmacol* 2001; 424: 221-227.
23. Chataigneau T, Feletou M, Huang PL, et al. Acetylcholine-induced relaxation in blood vessels from endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 219-226.
24. Chen JX, Meyrick B. Hypoxia increases Hsp90 binding to eNOS via PI3K-Akt in porcine coronary artery endothelium. *Lab Invest* 2004; 84: 182-190.
25. Cole WC, Welsh DG. Role of myosin light chain kinase and myosin light chain phosphatase in the resistance arterial myogenic response to intravascular pressure. *Arch Biochem Biophys* 2011; 510: 160-173.
26. Compeer MG, Janssen GM, De Mey JG. Endothelin-1 and endothelin-2 initiate and maintain contractile responses by different mechanisms in rat mesenteric and cerebral arteries. *Br J Pharmacol* 2013; 170: 1199-1209.
27. Conti MA, Adelstein RS. The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle myosin kinase by the catalytic subunit of 3':5' cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1981; 256: 3178-3181.
28. Corriu C, Feletou M, Canet E, Vanhoutte PM. Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig. *Br J Pharmacol* 1996; 119: 959-964.
29. Daut J, Maier-Rudolph W, von BN, et al. Hypoxic dilation of coronary arteries is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Science* 1990; 247: 1341-1344.
30. Deutsche Gesellschaft für Gefäßchirurgie. Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Gefäßchirurgie (*vaskuläre und endovaskuläre Chirurgie*) (DGG) Akuter Intestinalarterienverschluss. 10-9-2008. Ref Type: Data File

31. Dora KA, Garland CJ. Linking hyperpolarization to endothelial cell calcium events in arterioles. *Microcirculation* 2013; 20: 248-256.
32. Duprat F, Lesage F, Fink M, et al. TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J* 1997; 16: 5464-5471.
33. Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, et al. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 1998; 396: 269-272.
34. Fagan KA, Tyler RC, Sato K, et al. Relative contributions of endothelial, inducible, and neuronal NOS to tone in the murine pulmonary circulation. *Am J Physiol* 1999; 277: L472-L478.
35. Félétou M. The Endothelium: Part 2: EDHF-Mediated Responses "The Classical Pathway". San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences Publisher; 2011. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK57109/>
36. Feletou M. The Endothelium Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. Morgan & Claypool Life Sciences Publisher 2011. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK57149/>
37. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:1215-1225.
38. Fink M, Duprat F, Lesage F, et al. Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *EMBO J* 1996; 15: 6854-6862.
39. Fishman AP. Hypoxia on the pulmonary circulation. How and where it acts. *Circ Res* 1976; 38: 221-231.
40. Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, et al. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* 1999; 401: 493-497.
41. Franco-Obregon A, Urena J, Lopez-Barneo J. Oxygen-sensitive calcium channels in vascular smooth muscle and their possible role in hypoxic arterial relaxation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 4715-4719.
42. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.
43. Furchgott R. Endothelium-Dependent Relaxation in Systemic Arteries. In: Vanhoutte P, ed. *Relaxing and Contracting Factors*. Humana Press, 1988: 1-26.
44. Gardener MJ, Johnson IT, Burnham MP, et al. Functional evidence of a role for two-pore domain potassium channels in rat mesenteric and pulmonary arteries. *Br J Pharmacol* 2004; 142: 192-202.
45. Garry A, Fromy B, Blondeau N, et al. Altered acetylcholine, bradykinin and cutaneous pressure-induced vasodilation in mice lacking the TREK1 potassium channel: the endothelial link. *EMBO Rep* 2007; 8: 354-359.

46. Gauthier KM, Deeter C, Krishna UM, et al. 14,15-Epoxyeicosa-5(Z)-enoic acid: a selective epoxyeicosatrienoic acid antagonist that inhibits endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in coronary arteries. *Circ Res* 2002; 90: 1028-1036.
47. Goldstein SA, Bockenhauer D, O'Kelly I, Zilberberg N. Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 175-184.
48. Hampl V, Cornfield DN, Cowan NJ, Archer SL. Hypoxia potentiates nitric oxide synthesis and transiently increases cytosolic calcium levels in pulmonary artery endothelial cells. *Eur Respir J* 1995; 8: 515-522.
49. Hartmannsgruber V, Heyken WT, Kacik M, et al. Arterial response to shear stress critically depends on endothelial TRPV4 expression. *PLoS One* 2007; 2: e827.
50. Hennan JK, Huang J, Barrett TD, et al. Effects of selective cyclooxygenase-2 inhibition on vascular responses and thrombosis in canine coronary arteries. *Circulation* 2001; 104: 820-825.
51. Hermsteiner M, Zoltan DR, Doetsch J, et al. Human chorionic gonadotropin dilates uterine and mesenteric resistance arteries in pregnant and nonpregnant rats. *Pflugers Arch* 1999; 439: 186-194.
52. Hermsteiner M, Zoltan DR, Kunzel W. The vasoconstrictor response of uterine and mesenteric resistance arteries is differentially altered in the course of pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 100: 29-35.
53. Ho JJ, Man HS, Marsden PA. Nitric oxide signaling in hypoxia. *J Mol Med (Berl)* 2012; 90: 217-231.
54. Horman S, Morel N, Vertommen D, et al. AMP-activated protein kinase phosphorylates and desensitizes smooth muscle myosin light chain kinase. *J Biol Chem* 2008; 283: 18505-18512.
55. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 1995; 377: 239-242.
56. Huang Y, Cheung KK. Endothelium-dependent rhythmic contractions induced by cyclopiazonic acid in rat mesenteric artery. *Eur J Pharmacol* 1997; 332: 167-172.
57. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 9265-9269.
58. Ishida Y, Paul RJ. Effects of hypoxia on high-energy phosphagen content, energy metabolism and isometric force in guinea-pig taenia caeci. *J Physiol* 1990; 424: 41-56.
59. Jennings RB, Murry CE, Steenbergen C, Jr., Reimer KA. Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation* 1990; 82: II2-12.

60. Jensen LJ, Holstein-Rathlou NH. Is there a role for T-type Ca^{2+} channels in regulation of vasomotor tone in mesenteric arterioles? *Can J Physiol Pharmacol* 2009; 87: 8-20.
61. Justice JM, Tanner MA, Myers PR. Endothelial cell regulation of nitric oxide production during hypoxia in coronary microvessels and epicardial arteries. *J Cell Physiol* 2000; 182: 359-365.
62. Kamishima T, Davies NW, Standen NB. Mechanisms that regulate $[\text{Ca}^{2+}]_i$ following depolarization in rat systemic arterial smooth muscle cells. *J Physiol* 2000; 522 Pt 2: 285-295.
63. Kansui Y, Garland CJ, Dora KA. Enhanced spontaneous Ca^{2+} events in endothelial cells reflect signalling through myoendothelial gap junctions in pressurized mesenteric arteries. *Cell Calcium* 2008; 44: 135-146.
64. Ketchum KA, Joiner WJ, Sellers AJ, et al. A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 1995; 376: 690-695.
65. Klemke RL, Cai S, Giannini AL, et al. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol* 1997; 137: 481-492.
66. Kortmann B, Klar E. [Recognizing acute mesenteric ischaemia too late: reasons and diagnostic approach from a surgical point of view]. *Zentralbl Chir* 2005; 130: 223-226.
67. Lazdunski M, Frelin C, Vigne P. The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. *J Mol Cell Cardiol* 1985; 17: 1029-1042.
68. Le Cras TD, McMurtry IF. Nitric oxide production in the hypoxic lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280: L575-L582.
69. Leach RM, Sheehan DW, Chacko VP, Sylvester JT. Effects of hypoxia on energy state and pH in resting pulmonary and femoral arterial smooth muscles. *Am J Physiol* 1998; 275: L1051-L1060.
70. Lee MR, Li L, Kitazawa T. Cyclic GMP causes Ca^{2+} desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem* 1997; 272: 5063-5068.
71. Leone AM, Palmer RM, Knowles RG, et al. Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *J Biol Chem* 1991; 266: 23790-23795.
72. Leonoudakis D, Gray AT, Winegar BD, et al. An open rectifier potassium channel with two pore domains in tandem cloned from rat cerebellum. *J Neurosci* 1998; 18: 868-877.
73. Lesage F. Pharmacology of neuronal background potassium channels. *Neuropharmacology* 2003; 44: 1-7.

74. Lesage F, Guillemare E, Fink M, et al. TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EMBO J* 1996; 15: 1004-1011.
75. Lesage F, Reyes R, Fink M, et al. Dimerization of TWIK-1 K⁺ channel subunits via a disulfide bridge. *EMBO J* 1996; 15: 6400-6407.
76. Lesage F, Terrenoire C, Romey G, Lazdunski M. Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K⁺ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 2000; 275: 28398-28405.
77. Lopes CM, Zilberberg N, Goldstein SA. Block of Kcnk3 by protons. Evidence that 2-P-domain potassium channel subunits function as homodimers. *J Biol Chem* 2001; 276: 24449-24452.
78. Matoba T, Shimokawa H, Kubota H, et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 909-913.
79. McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, et al. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 272-277.
80. McQuillan LP, Leung GK, Marsden PA, et al. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Am J Physiol* 1994; 267: H1921-H1927.
81. Mendoza SA, Fang J, Gutterman DD, et al. TRPV4-mediated endothelial Ca²⁺ influx and vasodilation in response to shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 298: H466-H476.
82. Meng W, Ayata C, Waeber C, et al. Neuronal NOS-cGMP-dependent ACh-induced relaxation in pial arterioles of endothelial NOS knockout mice. *Am J Physiol* 1998; 274: H411-H415.
83. Mount PF, Kemp BE, Power DA. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42: 271-279.
84. Mustafa AK, Sikka G, Gazi SK, et al. Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. *Circ Res* 2011; 109: 1259-1268.
85. Nagesetty R, Paul RJ. Effects of pHi on isometric force and [Ca²⁺]_i in porcine coronary artery smooth muscle. *Circ Res* 1994; 75: 990-998.
86. Nase GP, Tuttle J, Bohlen HG. Reduced perivascular PO₂ increases nitric oxide release from endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H507-H515.
87. Obara K, Bowman PS, Ishida Y, Paul RJ. Effects of hypoxia on [Ca²⁺]_i, pHi and myosin light chain phosphorylation in guinea-pig taenia caeci. *J Physiol* 1997; 503 (Pt 2): 427-433.

88. Otter D, Austin C. Mechanisms of hypoxic vasodilatation of isolated rat mesenteric arteries: a comparison with metabolic inhibition. *J Physiol* 1999; 516 (Pt 1): 249-259.
89. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.
90. Paternotte E, Gaucher C, Labrude P, et al. Review: behaviour of endothelial cells faced with hypoxia. *Biomed Mater Eng* 2008; 18: 295-299.
91. Pfeil U, Kuncova J, Bruggmann D, et al. Intrinsic vascular dopamine - a key modulator of hypoxia-induced vasodilatation in splanchnic vessels. *J Physiol* 2014; 592: 1745-1756.
92. Pohl U, Busse R. Hypoxia stimulates release of endothelium-derived relaxant factor. *Am J Physiol* 1989; 256: H1595-H1600.
93. Putzke C, Wemhoner K, Sachse FB, et al. The acid-sensitive potassium channel TASK-1 in rat cardiac muscle. *Cardiovasc Res* 2007; 75: 59-68.
94. Quilley J, McGiff JC. Is EDHF an epoxyeicosatrienoic acid? *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21: 121-124.
95. Rahman A, Hughes A, Matchkov V, et al. Antiphase oscillations of endothelium and smooth muscle $[Ca^{2+}]_i$ in vasomotion of rat mesenteric small arteries. *Cell Calcium* 2007; 42: 536-547.
96. Rahman A, Matchkov V, Nilsson H, Aalkjaer C. Effects of cGMP on coordination of vascular smooth muscle cells of rat mesenteric small arteries. *J Vasc Res* 2005; 42: 301-311.
97. Roman LJ, Martasek P, Masters BS. Intrinsic and extrinsic modulation of nitric oxide synthase activity. *Chem Rev* 2002; 102: 1179-1190.
98. Russell FD. Urotensin II in cardiovascular regulation. *Vasc Health Risk Manag* 2008; 4: 775-785.
99. Sadow SL, Hill CE. Incidence of myoendothelial gap junctions in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses. *Circ Res* 2000; 86: 341-346.
100. Schuster A, Oishi H, Beny JL, et al. Simultaneous arterial calcium dynamics and diameter measurements: application to myoendothelial communication. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H1088-H1096.
101. Schwartzkopff B, Hennersdorf M. [Influence of cardiac circulation and medication on the perfusion of the intestine]. *Zentralbl Chir* 2005; 130: 218-222.
102. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-732.
103. Shaul PW, Wells LB, Horning KM. Acute and prolonged hypoxia attenuate endothelial nitric oxide production in rat pulmonary arteries by different mechanisms. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22: 819-827.

104. Shimizu S, Bowman PS, Thorne G, III, Paul RJ. Effects of hypoxia on isometric force, intracellular Ca(2+), pH, and energetics in porcine coronary artery. *Circ Res* 2000; 86: 862-870.
105. Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, et al. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 28: 703-711.
106. Silva JM, Saldanha C. Arterial endothelium and atherothrombogenesis II--the role of endothelial dysfunction in atherothrombotic lesions. *Rev Port Cardiol* 2006; 25: 1159-1186.
107. Standen NB, Quayle JM, Davies NW, et al. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Science* 1989; 245: 177-180.
108. Steiner DR, Gonzalez NC, Wood JG. Interaction between reactive oxygen species and nitric oxide in the microvascular response to systemic hypoxia. *J Appl Physiol* (1985) 2002; 93: 1411-1418.
109. Surks HK, Mochizuki N, Kasai Y, et al. Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase I α . *Science* 1999; 286: 1583-1587.
110. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, et al. Role of endothelin in the control of peripheral vascular tone in human hypertension. *Heart Fail Rev* 2001; 6: 277-285.
111. Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Luedike P, et al. Nitrite regulates hypoxic vasodilation via myoglobin-dependent nitric oxide generation. *Circulation* 2012; 126: 325-334.
112. Triggle CR, Samuel SM, Ravishankar S, et al. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. *Can J Physiol Pharmacol* 2012; 90: 713-738.
113. Tsutsui M, Shimokawa H, Otsuji Y, Yanagihara N. Pathophysiological relevance of NO signaling in the cardiovascular system: novel insight from mice lacking all NO synthases. *Pharmacol Ther* 2010; 128: 499-508.
114. Victor VM, Nunez C, D'Ocon P, et al. Regulation of oxygen distribution in tissues by endothelial nitric oxide. *Circ Res* 2009; 104: 1178-1183.
115. Walshe TE, D'Amore PA. The role of hypoxia in vascular injury and repair. *Annu Rev Pathol* 2008; 3: 615-643.
116. Xu XP, Tanner MA, Myers PR. Prostaglandin-mediated inhibition of nitric oxide production by bovine aortic endothelium during hypoxia. *Cardiovasc Res* 1995; 30: 345-350.
117. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 411-415.

118. Yuan XJ, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. Contrasting effects of hypoxia on tension in rat pulmonary and mesenteric arteries. *Am J Physiol* 1990; 259: H281-H289.
119. Zweier JL, Samouilov A, Kuppusamy P. Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411: 250-262.

12) Anhang

12.1) Datentabellen

Tabelle I: Messdaten der Kontrollgruppe

Nr.	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	156,5	155,5	-0,64	-6,61	156	-0,32	-3,31	158	0,96	26,76
2	145	143,5	-1,03	-10,70	146,5	1,03	28,88	149	2,76	77,02
3	109	114	4,59	128,07	113	3,67	102,46	112	2,75	76,84
4	111,5	110,5	-0,90	-9,28	110	-1,35	-13,92	109	-2,24	-23,19
5	131	132,5	1,15	31,97	132	0,76	21,31	131,5	0,38	10,66
6	158,5	163	2,84	79,27	165	4,10	114,49	166	4,73	132,11
7	134	133	-0,75	-7,72	133	-0,75	-7,72	133	-0,75	-7,72
8	172	173	0,58	16,23	173	0,58	16,23	173	0,58	16,23
9	160	161	0,63	17,45	161	0,63	17,45	161	0,63	17,45
10	154	153	-0,65	-6,72	153	-0,65	-6,72	153	-0,65	-6,72

A: Ausgangsdurchmesser bei Normoxie [μm]; **B:** Durchmesser bei 14,4% O_2 [μm]; **C:** Anteil von B an A [%]; **D:** Anteil von B an maximaler Reaktion (Konstriktion bzw. Dilatation) [%] **E:** Durchmesser bei 12,2% O_2 [μm]; **F:** Anteil von E an A [%]; **G:** Anteil von E an maximaler Reaktion [%]; **H:** Durchmesser bei 2,7% O_2 [μm]; **I:** Anteil von H an A [%]; **J:** Anteil von H an maximaler Reaktion [%]; negatives Vorzeichen: Konstriktion

Tabelle II: Messdaten der Versuche in calciumfreier Tyrode-Lösung

Nr.	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	124	125	0,81	22,52	127,5	2,82	78,80	128,5	3,63	101,32
2	129	126,5	-1,94	-20,05	128,5	-0,39	-4,01	129	0,00	0,00
3	130,5	131	0,38	10,70	132	1,15	32,09	132	1,15	32,09
4	158,5	159	0,32	8,81	158,5	0,00	0,00	159	0,32	8,81
5	159	160	0,63	17,56	160	0,63	17,56	160	0,63	17,56
6	150,5	153	1,66	46,38	153	1,66	46,38	153,5	1,99	55,65
7	151	153	1,32	36,98	154	1,99	55,47	154,5	2,32	64,71
8	149	148,5	-0,34	-3,47	150	0,67	18,74	150	0,67	18,74

A: Ausgangsdurchmesser bei Normoxie [μm]; **B:** Durchmesser bei 14,4% O_2 [μm]; **C:** Anteil von B an A [%]; **D:** Anteil von B an maximaler Reaktion (Konstriktion bzw. Dilatation) [%] **E:** Durchmesser bei 12,2% O_2 [μm]; **F:** Anteil von E an A [%]; **G:** Anteil von E an maximaler Reaktion [%]; **H:** Durchmesser bei 2,7% O_2 [μm]; **I:** Anteil von H an A [%]; **J:** Anteil von H an maximaler Reaktion [%]; negatives Vorzeichen: Konstriktion

Anhang

Tabelle III: Messdaten der Versuche in Nickelchlorid-haltiger Tyrode-Lösung

Nr.	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	164	158	-3,66	-37,85	158	-3,66	-37,85	158	-3,66	-37,85
2	137	135,5	-1,09	-11,33	135	-1,46	-15,10	135	-1,46	-15,10
3	174	172,5	-0,86	-8,92	172	-1,15	-11,89	172	-1,15	-11,89
4	162	160	-1,23	-12,77	160	-1,23	-12,77	160	-1,23	-12,77
5	151,5	150,5	-0,66	-6,83	150,5	-0,66	-6,83	150,5	-0,66	-6,83
6	139,5	139	-0,36	-3,71	139	-0,36	-3,71	138	-1,08	-11,12

A: Ausgangsdurchmesser bei Normoxie [μm]; **B:** Durchmesser bei 14,4% O_2 [μm]; **C:** Anteil von B an A [%]; **D:** Anteil von B an maximaler Reaktion (Konstriktion bzw. Dilatation) [%] **E:** Durchmesser bei 12,2% O_2 [μm]; **F:** Anteil von E an A [%]; **G:** Anteil von E an maximaler Reaktion [%]; **H:** Durchmesser bei 2,7% O_2 [μm]; **I:** Anteil von H an A [%]; **J:** Anteil von H an maximaler Reaktion [%]; negatives Vorzeichen: Konstriktion

Tabelle IV: Messdaten der eNOS^{-/-}-Mäuse

Nr.	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	131	131	0,00	0,00	131	0,00	0,00	132	0,76	21,31
2	131	131	0,00	0,00	133	1,53	42,62	133	1,53	42,62
3	251,5	253	0,60	16,65	253,5	0,80	22,20	254	0,99	27,75
4	256,5	257	0,19	5,44	258,5	0,78	21,77	260,5	1,56	43,54
5	119,5	118,5	-0,84	-8,66	119	-0,42	-11,68	118,5	-0,84	-8,66
6	118,5	118,5	0,00	0,00	119	0,42	11,78	119	0,42	11,78
7	124	122,5	-1,21	-12,51	121	-2,42	-25,03	120	-3,23	-33,37
8	121	118,5	-2,07	-21,37	117	-3,31	-34,20	117,5	-2,89	-29,92

A: Ausgangsdurchmesser bei Normoxie [μm]; **B:** Durchmesser bei 14,4% O_2 [μm]; **C:** Anteil von B an A [%]; **D:** Anteil von B an maximaler Reaktion (Konstriktion bzw. Dilatation) [%] **E:** Durchmesser bei 12,2% O_2 [μm]; **F:** Anteil von E an A [%]; **G:** Anteil von E an maximaler Reaktion [%]; **H:** Durchmesser bei 2,7% O_2 [μm]; **I:** Anteil von H an A [%]; **J:** Anteil von H an maximaler Reaktion [%]; negatives Vorzeichen: Konstriktion

Tabelle V: Messdaten der TASK1^{-/-}-Mäuse

Nr.	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	158	158	0,00	0,00	159	0,63	17,67	159	0,63	17,67
2	160	159,5	-0,31	-3,23	156,5	-2,19	-22,63	156	-2,50	-25,86
3	138	139	0,72	20,23	139	0,72	20,23	138	0,00	0,00
4	142	144	1,41	39,32	145	2,11	58,98	145,5	2,46	68,81

A: Ausgangsdurchmesser bei Normoxie [μm]; **B:** Durchmesser bei 14,4% O_2 [μm]; **C:** Anteil von B an A [%]; **D:** Anteil von B an maximaler Reaktion (Konstriktion bzw. Dilatation) [%] **E:** Durchmesser bei 12,2% O_2 [μm]; **F:** Anteil von E an A [%]; **G:** Anteil von E an maximaler Reaktion [%]; **H:** Durchmesser bei 2,7% O_2 [μm]; **I:** Anteil von H an A [%]; **J:** Anteil von H an maximaler Reaktion [%]; negatives Vorzeichen: Konstriktion

12.2) Danksagung

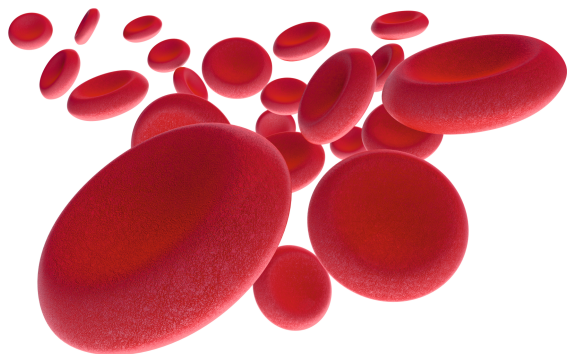
Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Michael Henrich für die Möglichkeit zur Promotion und die sehr intensive und geduldige Betreuung während meiner ersten Schritte in der wissenschaftlichen Arbeit. Vielen Dank für die zahlreichen fachlichen Gespräche und kreativen Anregungen und Rückmeldungen.

Bei Dr. Katja Weismüller bedanke ich mich für die gute und lehrreiche Betreuung und die intensive Einarbeitung. Auch möchte ich ihr für die Unterstützung während der im Verlauf der Arbeit auftretenden Probleme danken.

Bei Frau Ilona Magel möchte ich mich besonders für ihre Unterstützung bei der Bewältigung der Aufgaben im Labor bedanken. Sie stand mir immer zur Seite wenn ich Hilfe benötigte und die Arbeit mit ihr hat viel Spaß gemacht.

Danke an die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Kummer aus dem anatomischen Institut der JLU Gießen für die Bereitstellung der TASK1^{-/-} Mäuse.

Vielen Dank an die Arbeitsgruppe von PD Dr. Konrad für die Möglichkeit, das Mikrogefäßlabor nutzen zu können. Mein Dank gilt in diesem Zusammenhang besonders Frau Zoltan, die immer für Fragen zu den Geräten im Mikrogefäßlabor zur Verfügung stand.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6406-8

